UNTERSUCHUNGEN ZUR GEWEBEBINDUNG UND INAKTIVIERUNG DREIER ANTIBIOTIKA IN ORGANHOMOGENATEN

Reiner Pollok

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523705_0041

Aus dem Zentrum der Hygiene der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
(Direktor: Prof. Dr. med. H. Knothe)

Untersuchungen zur Gewebebindung und Inaktivierung dreier Antibiotika in Organhomogenaten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Reiner Pollok
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 1983

Dekan : Prof. Dr. med. H.-J. Müller

Referent : Prof. Dr. med. H. Knothe

Korreferent : Prof. Dr. med. W. Mondorf

Tag der mündlichen Prüfung : 28. MRZ 1983

UNIV. LEIDEN BIBL.

Druck: Dipa - Druck, 6000 Frankfurt, Tel. 55 61 88

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methode	4
2. 1.	Antibiotika	4
2. 2.	Nährmedien	4
2. 3.	Chemikalien	5
2. 4.	Versuchstiere	5
2. 5.	Keime	6
2. 6.	Herstellung der Pufferlösung	6
2. 7.	Organgewinnung und Homogenatherstellung	6
2. 8.	Herstellung des Agars	7
2. 9.	Herstellung der Sarcinea lutea Suspension	8
2.10.	Herstellung der Bacillus subtilis Sporensuspension	8
2.11.	Inokulation des Agars	9
2.12.	Bestimmung der Antibiotikakonzentration	9
2.13.	Eichkurven	11
2.14.	Rückgewinnung der Antibiotika in Abhängigkeit von der Homogenatpräparation	12
2.15.	Rückgewinnung der Antibiotika in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration	13
2.16.	Rückgewinnung der Antibiotika in Abhängigkeit vom Proteingehalt	14
2.17.	Rückgewinnung der Antibiotika in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 20°, 30° und 37°C	14
2.18.	Bestimmung des Proteingehaltes	15
2.19.	Sterilitätskontrollen	16
3.	Ergebnisse	18
3. 1.	Eichkurven	18
3. 2.	Rückgewinnung der Antibiotika in Abhängigkeit von der Homogenatpräparation	20
3. 3.	Rückgewinnung der Antibiotika in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration	26

Seite

3. 4. Rückgewinnung der Antibiotika in Abhängigkeit vom Proteingehalt 33

3. 5. Rückgewinnung der Antibiotika in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 37°C 37

3. 6. Rückgewinnung der Antibiotika in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 20°C und 30°C 42

3. 7. Bestimmung des Proteingehaltes 46

4. Diskussion 47

5. Zusammenfassung 55

6. Literaturverzeichnis 56

1. Einleitung

Die Voraussetzung für die Wirksamkeit eines Antibiotikums ist ein ausreichend hoher und genügend lange anhaltender Wirkstoffspiegel am Ort der Infektion, d.h. nicht nur im Serum, sonder auch im Gewebe (Weingärtner, 1954; Linzenmeier et al., 1968; Truss et al., 1971, Craig und Kunin, 1976). Dieser Spiegel garantiert zwar noch nicht die Wirksamkeit, er ist aber Voraussetzung, ohne die eine Wirksamkeit nicht erwartet werden kann (Wysocki, 1976).

Die Konzentration eines Chemotherapeutikums im Gewebe muss die minimale wachstumshemmende Konzentration (MIC) übersteigen; erst dann ist mit einem Erfolg der Therapie zu rechnen (Kuemmerle und Contzen, 1962; Brumfitt et al., 1964).

Nach der chemotherapeutischen Formel von Naumann (1963) ist für eine erfolgversprechende Therapie neben der minimalen Hemmkonzentration 'in vitro' die erreichbare Konzentration 'in vivo' der entscheidende Parameter. Unter der Bezeichnung 'in vivo' wird meist der Blutspiegel verstanden, doch ist auf Grund der Höhe dieses Spiegels noch keine schlüssige Aussage über antibakteriell wirksame Titer im peripheren Gewebe möglich (Hierholzer et al., 1966).

Im Gegensatz zur Bestimmung der Antibiotikaspiegel in Blut, Plasma oder Serum, die vielerorts zur Routinemethode geworden ist, gelten für die Bestimmung der Wirkstoffspiegel im Gewebe besondere Vorbehalte (Sabath et al., 1978). Eine direkte Ermittlung des Wirkstoffspiegels in der Interzellulärflüssigkeit ist aus technischen Gründen nicht möglich, so dass man auf andere Parameter, z.B. die Konzentrationsbestimmung im Gewebehomogenat, angewiesen ist (Tiesler et al., 1976).

Die Wirkstoffspiegelbestimmung wird hierbei durch eine Vielzahl die Messwerte beeinflussender Faktoren kompliziert. Zu solchen Störfaktoren zählen neben einer möglichen enzymatischen Metabolisierung der Antibiotika ebenso eine Inaktivierung durch Bindung an Proteine, Lipide, Polysaccharide, Heparin, Elektrolyte u.a. (Kunin, 1970; Bergmeyer, 1974; Kornguth et al., 1974).

In der vorliegenden Arbeit wurden in einem in vitro-Modell in Anlehnung an Untersuchungen anderer Autoren (Kunin, 1970; Peterson et al., 1979; Dette und Finke, 1979; Gerber et al., 1980; Zeh, 1981) die Wiedergewinnungsraten dreier Antibiotika aus Organhomogenaten des Meerschweinchens in Abhängigkeit von verschiedenen experimentellen Parametern untersucht und miteinander verglichen.

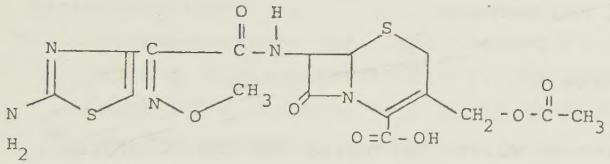
Bei dem in dieser Arbeit angewandten Verfahren der Organgewinnung und -verarbeitung wurden die Strukturelemente der Gewebe weitgehendst zerstört. Auf die mit Organhomogenat versetzten Antibiotika konnte somit eine Vielzahl potentiell inaktivierender Faktoren einwirken, die ausschnittsweise denjenigen unter in vivo-Bedingungen entsprechen.

In Tabelle 1 sind die Summenformeln und Molekulargewichte und in Abbildung 1 die Strukturformeln der in dieser Arbeit untersuchten Antibiotika wiedergegeben.

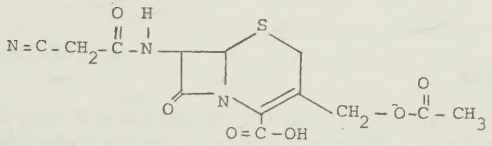
Cefotaxim	$C_{16}H_{16}O_7N_5S_2Na$	477,50
Cephacetril	$C_{13}H_{12}O_6N_3S\ Na$	361,31
Rifampicin	$C_{43}H_{58}O_{12}N_4$	822,97

Tabelle 1: Summenformeln und Molekulargewichte der untersuchten Antibiotika

CEFOTAXIM



CEPHACETRIL



RIFAMPICIN

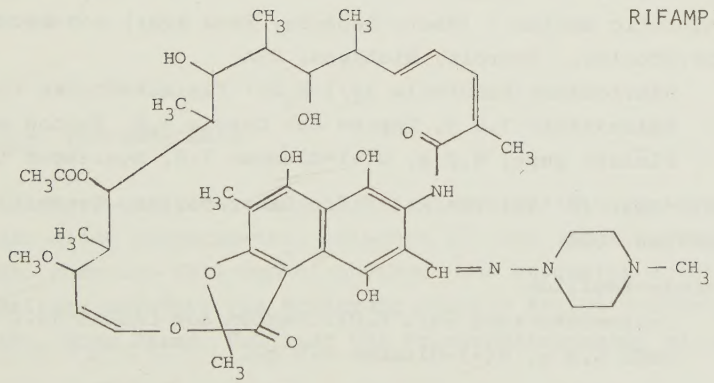


Abbildung 1: Strukturformeln der untersuchten Antibiotika.

2. Material und Methode

2.1. Antibiotika

Als Testsubstanzen wurden Cefotaxim (HR 756, Claforan^{R}, Charge 036, Aktivität 935 µg/mg) von Fa. Hoechst AG, Ffm., Cephacetril (Celospor^{R}, Charge 13-77, Aktivität 988 µg/mg) von Fa. Ciba-Geigy, Wehr/ Baden und Rifampicin (Rimactan^{R}, Charge 4110829, Aktivität 997 µg/mg) von Fa. Ciba-Geigy, Wehr/ Baden eingesetzt.

2.2. Nährmedien

Antibiotic medium 3 (Bacta Penassay Broth dehydrated) von Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Nährbodenbestandteile (g/l H_2O): Fleischextrakt 1,5 g, Hefeextrakt 1,5 g, Pepton aus Fleisch pept. 5,0 g, D(+)-Glucose 1,0 g, NaCl 3,5 g, $KHPO_4$ 3,68 g, KH_2PO_4 1,32 g.

Antibiotic medium 1 (Bacto Penassay Seed Agar) von Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Nährbodenbestandteile (g/l H_2O): Fleischextrakt 1,5 g, Hefeextrakt 3,0 g, Pepton aus Casein 4,0, Pepton aus Fleisch pept. 6,0 g, D(+)-Glucose 1,0, Agar-Agar 15,0 g.

Bacto-Agar (B 140) von Fa. Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

Glucose-Bouillon

Zusammensetzung (g/l H_2O): Pepton aus Casein 10,0 g, NaCl 5,0 g, D(+)-Glucose 5,0 g.

Blutagar

Zusammensetzung g/l H_2O): Herzextrakt 10,0, Tryptose 10,0 g, NaCl 5.0 g, Agar-Agar 15.0 g, 60 ml defibriniertes Blut.

Bitter-Neu-Agar

Zusammensetzung (g/l H_2O): Pepton aus Fleisch pept. 10,0 g, Fleischextrakt 8,0 g, Agar-Agar 25,0 g, NaCl 5,0 g, Lactose 15,0 g, 15 ml einer 1%-igen Anilinblaulösung.

Noutrient-Bouillon von Fa. Difco Laboratoires, Detroit, Michigan, USA

Zusammensetzung(g/l H_2O): Bacto-Beef Extract 3,0 g, Bacto-Peptone 5,0 g.

2.3. Chemikalien

Albumin aus Rinderserum (kristallin reinst, 99,4%) von Fa. Serva, Heidelberg.

Folin-Ciocalteau Phenolreagenz von Fa. Merck, Darmstadt.

Alle anderen verwendeten Substanzen waren von p.a.-Qualität und wurden ausschliesslich von Fa. Merck, Darmstadt bezogen.

2.4. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 8 bis 10 Wochen alte Meerschweinchen mit einem Körpergewicht zwischen 250 und 300 g verwendet. Bei normalem Hell-Dunkel-Rhythmus und ansonsten artgerechter Haltung erfolgte die Ernährung mittels Pellot-Trockenfutter (Fa. Hope Farms, Holland) bei Trinkwasserangebot ad libitum.

2.5. Keime

Als Testkeime wurden Sarcinea lutea ATCC 9341 und Bacillus subtilis ATCC 6633 (American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, USA) verwendet.

2.6. Herstellung der Pufferlösung

Zur Herstellung der Antibiotika-Stammlösungen, sowie zur Präparation und weiteren Verdünnung der Organhomogenate wurde ein 0,1 molarer Natrium-Kalium-Phosphatpuffer, pH-Wert 6,0 verwendet. Die pH-Wert Einstellung des Puffers erfolgte bei kontinuierlicher Messung mittels einer Glaseletrode (pH-meter, Typ 511, Nr. 5354, Fa. Knick, Ffm.) unter Zugabe von einer 0,1 molaren di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydratlösung ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, MG 177.99) zu einer 0,1 molaren KH_2PO_4 Lösung.

2.7. Organgewinnung und Homogenatherstellung

Die Meerschweinchen wurden durch Genickschlag getötet, anschliessend dekapitiert und ausgeblutet. Nach Rasur des Brust- und Bauchfells erfolgte eine gründliche Desinfektion mit Koden-Spray (Schülke & Mayr, Hamburg). Unter weitgehendst sterilen Kautelen wurden mittels eines Medianschnittes Thorax und Abdomen eröffnet und anschliessend Lunge, Leber und Nieren entnommen. Sofort nach der Entnahme als auch während der gesamten Weiterverarbeitungszeit wurden die Organe im Eisbad gekühlt. Vor dem Wiegen der Organe wurden, soweit vorhanden, Fett und bindegewebige Strukturen entfernt. Danach wurden die Organe mit einer Schere grob zerkleinert und mit Phosphatpuffer (o,1 M, pH 6,0)

im Verhältnis 1:1 (Verdünnung 1:2) versetzt. Die anschliessende Homogenisierung der mit Puffer verdünnten Organteile wurde mit einem Sorvall Omnimixer Homogenizer (Fa. DuPont Instruments-Sorvall, Newton, CT, USA) bei rpm max. (16.000 rpm) durchgeführt. Hierbei wurde jeweils nach zweiminütigem Homogenisieren eine Pause von zwei Minuten eingelegt. Die Gesamtdauer der Homogenisierung betrug sechs Minuten.
Die so gewonnenen Leber-, Lungen- und Nierenhomogenate waren Grundlage für sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Sie wurden anschliessend, entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung, zu unterschiedlichen Mengen in sterile Kunststoffröhrchen (Sorvall, Polypropylen, 18 x 100 mm, 16 ml Volumen) bzw. in sterile Wassermannröhrchen abgefüllt. Die weitere Verarbeitung der Organhomogenate erfolgte in den oben angegebenen Röhrchen.

Für jeden Versuchstag wurden die benötigten Organe neu entnommen. Der Zeitraum von der Organentnahme bis zur Homogenatfertigstellung betrug im Mittel 40 Minuten.

2.8. Herstellung des Agars

Für den Agardiffusionstest wurden je nach verwendetem Antibiotikum zwei unterschiedliche Nährböden benutzt. Für die Herstellung des Agars wurden bei den Arbeiten mit Cephacetril und Cefotaxim 30,5 g Antibiotic medium 1 und bei denen mit Rifampicin eine Mischung aus 15 g Difco Bacto-Agar und 17,5 g Antibiotic medium 3 abgewogen. Die genannten Substanzen wurden dann jeweils in 1 l Aqua bidestillata aufgelöst und anschliessend 15 min bei 121°C und 1,3 atm. autoclaviert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde der flüssige Agar im Wasserbad bei einer Temperatur von 50-55°C aufbewahrt.

2.9. Herstellung der Sarcina Lutea Suspension

Sarcina lutea diente als Testkeim zur Bestimmung der Rifampicin-Konzentration.
Die Sarcinen wurden mit einer sterilen Öse von einer Dauerkultur auf eine Bitter-Platte übertragen und in 3 Richtungen ausgestrichen. Nach 24 Stunden aerober Bebrütung bei 37°C wurden von je einer Einzelkolonie 1 Öse in je 5 ml Glucoseboullion überimpft und diese anschliessend für 18 Std. im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Boullion der Schüttelkulturen in sterile Zentrifugenröhrchen abgefüllt und für 10 min mit 2.683 x g bei 22°C zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugate wurde verworfen und die Präzipitate mit je 0,5 ml Phosphatpuffer resuspendiert. Sämtliche Suspensionen wurden zusammengegeben und als Stammsuspension weiter verwendet.

2.10. Herstellung der Bacillus subtilis Sporensuspension

Bacillus subtilis diente als Testkeim zur Bestimmung der Cephacetril- und Cefotaxim-Konzentration.
Bacillus subtilis wurde einer Reinkultur entnommen, auf Bacto-Penassay Seed Agarplatten ausgespatelt und für 6 Tage bei 37°C aerob bebrütet. Um eine weitere Zunahme der Sporenbildung zu erreichen, wurden die Agarplatten 24 Std. bei 22°C und danach 24 Std. bei 4°C gelagert. Die mit Sporen angereicherten Platten wurden mit sterilem Aqua destillata abgespült, und die so erhaltene Sporensuspension zu gleichen Teilen in sterile Sorvallröhrchen gegeben. Nach 45-minütiger Inkubation im Schüttelwasserbad bei 65°C wurde die Sporensuspension für 20 min bei 3.000 x g zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugate wurde verworfen und die Präzipitate mit sterilem Aqua destillata resuspendiert. Zur weiteren Reinigung der Sporen wurde die

Zentrifugation und die Resuspendierung dreimal wiederholt. Danach wurden die gereinigten Sporensuspensionen nochmals für 30 min bei 65°C inkubiert und anschliessend auf eventuell vorhandene Fremdkeime mittels Überimpfung auf Bitter- und Blutagarplatten untersucht.
Alle nicht verunreinigten Sporensuspensionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.11. Inokulation des Agars

Auf den Agarplatten ist eine optimale Keimzahl dann erreicht, wenn es nach der Keimaussaat und der anschliessenden Bebrütung des Nährbodens nach 18 Std. zu dicht stehenden Kolonien, jedoch nicht zu konfluierendem Wachstum gekommen ist (Normenausschuss, 1981).
Zur Austestung der optimalen Keimzahl wurden Probeplatten des jeweiligen Nährmediums mit unterschiedlich zugesetzten Volumina der Sarcina lutea Stammsuspension, bzw. der Bacillus subtilis Sporensuspension gegossen. Die optimale Konzentration lag für Sarcina lutea zwischen 50 und 100 µl und für Bacillus subtilis zwischen 100 und 200 µl der jeweiligen Stammsuspension auf 1000 ml Agar. Das so ermittelte Arbeitsvolumen wurde für jede Charge neu bestimmt und während der gesamten Untersuchung beibehalten.

2.12. Antibiotikakonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der jeweiligen Antibiotikakonzentration erfolgte ausschliesslich im Lochplatten-Agar-Diffusionsverfahren.
Zur Herstellung der Agarplatten wurden waagerecht gelagerte, sterilisierte Kristallglasplatten mit aufgelegten Kunststoffringen (Innendurchmesser 19 cm) verwendet. In die

Ringe wurden je 50 ml des mit der optimalen Sarcinen- bzw. Bacillus-subtilis-Sporenzahl versetzten Agars gegossen. In den abgekühlten und erstarrten Agar wurden unter Zuhilfenahme eines angeschliffenen Stahlrohres 13 kreisrunde Löcher mit einem Volumen von jeweils 100 µl eingestanzt. Durch eine unter die Glasplatten gelegte Schablone konnte auf allen Platten eine gleiche Anordnung der Stanzlöcher zueinander erreicht werden. In jedes der 13 Stanzlöcher wurden in randomisierter Reihenfolge (Linder, 1959) jeweils 100 µl der vorbereiteten Proben- und Standardlösungen gegeben. Hierbei wurde so verfahren, dass auf jeder Platte neben 3 Standardlösungen sämtliche Proben oder Teilproben einer Versuchsanordnung plaziert wurden. Um eine Verunreinigung der Platten zu verhindern, wurden diese sofort mit sterilen Glasplatten abgedeckt und anschliessend für 18 Std. bei 37°C bebrütet.
Die Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe wurden mit einer Schublehre auf 0,1 mm genau gemessen und in mm angegeben. Als Grenzen galten hierbei die Ränder des deutlich in der Koloniegrösse reduzierten Keimwachstums (Ericsson et al., 1971).
Nicht zirkuläre oder konfluierende Hemmhöfe, ebenso kontaminierte Platten wurden von der Messung ausgeschlossen.

Die ermittelten Hemmhofdurchmesser wurden in der Reihenfolge 1 bis 13 aufgezeichnet und nach Abschluss der Messung den randomisierten Platzstellen zugeordnet.

In der Regel wurden für jeden Versuch 6 Agarplatten gegossen, so dass für jede Probe in der Auswertung zwischen 5 und 8 Messwerte vorlagen. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt.

Im Agarplatten-Diffusionstest besteht zwischen der Hemmhofgrösse eines Antibiotikums und dem dekadischen Logarithmus der eingesetzten Antibiotikakonzentration eine

proportionale Beziehung, die sich durch eine mathematische Funktion des Typs f (x) = ax + b beschreiben lässt.

Da der Gesamtkurvenverlauf jedoch parabelförmig ist, gilt diese Beziehung nur dann, wenn lineare Kurvenabschnitte betrachtet werden.

Um den Grad des linearen Zusammenhanges zu messen, wurde für jede Platte mittels der mitgeführten Standardwerte eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Messwerte von Platten mit Korrelationskoeffizienten von r kleiner + 0.9 bzw. - 0.9 wurden nicht berücksichtigt. Die Wiedergewinnungsraten der eingesetzten Antibiotikakonzentrationen wurden mittels linearer Regression aus den Messwerten der Hemmhofdurchmesser (mm) berechnet. Aus den so ermittelten Konzentrationen wurden zusätzlich das arithmetische Mittel ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (SD) errechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines Hewlett-Packard Rechners (HP 32E, Fa. Hewlett Packard, USA).

2.13. Eichkurven

Von allen untersuchten Antibiotika wurden mittels des Agardiffusionsverfahrens Eichkurven erstellt. Diese wurden in 6-fachem Ansatz aus mindestens 10 Einzelkonzentrationen des jeweiligen Antibiotikums ermittelt.
Als Arbeitsbereich wurden die eingesetzten Konzentrationen festgelegt, die sich im linearen Bereich der Eichkurven befanden, d.h. bei denen sich in der Regel ein Hemmhofdurchmesser zwischen 19 mm und 45 mm ergab.

2.14. Rückgewinnung eines Antibiotikums aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Homogenatpräparation bei konstanter Antibiotikakonzentration und konstantem Proteingehalt

In 4 Sorvall- und 4 Wassermannröhrchen wurden je 5 g Organhomogenat und in 2 weitere Wassermannröhrchen je 5 ml Phosphatpuffer gegeben. Sämtliche Röhrchen wurden mit 100 µl Antibiotikalösung gleicher Endkonzentration versetzt, sofort auf einem Rotationsmischer gemischt und anschliessend bis zur weiteren Verarbeitung im Eisbad aufbewahrt.
Zwei der mit Homogenat versetzten Wassermannröhrchen wurden 10 min mit 2.680 x g bei 22°C (Hettich Tischzentrifuge, Rotanda S, Fa. Hettich, Tuttlingen) und die 4 mit Homogenat versetzten Sorvallröhrchen 30 min mit 49.000 x g bei 4°C (Rotor SM 24, Sorvall RC 2B, I. Sorvall Inc., Newton, CT, USA) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände mittels einer sterilen Pasteur-Pipette abgehoben, jeweils in sterile Wassermannröhrchen gefüllt und im Eisbad aufbewahrt. Ein Teil der Überstände nach Zentrifugation mit 49.000 x g wurde unter Volumenerfassung sofort in ein Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt und 60 min mit 100.000 x g bei 4°C (Rotor RPS 40 T, Präparative UZ 65P, Hitachi, Japan) zentrifugiert. Der abpipettierte Überstand wurde in ein Wassermannröhrchen gefüllt und zu den übrigen in das Eisbad gegeben.

Nachdem sämtliche jeweilig aufbereiteten Organhomogenatüberstände vorlagen, wurde die Antibiotikakonzentrationsbestimmung durchgeführt.
Hierbei wurden jeweils 100 µl der Organhomogenate (Verdünnung 1:2), der Überstände nach Zentrifugation mit 2.680, 49.000 und 100.000 x g und der Antibiotika-Phosphatpufferlösung in randomisierter Reihenfolge auf die Loch-Agar-Platten aufgetragen. Nach 18-stündigem

Bebrüten der Platten und anschliessendem Ausmessen der Hemmhöfe konnte die wiedergewonnene Antibiotikakonzentration mittels linearer Regression aus den mitgeführten Standardwerten des Antibiotikums berechnet werden.

2.15. Rückgewinnung eines Antibiotikums aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der eingesetzten Antibiotikakonzentration bei konstanter Inkubationszeit (Eisbad) und konstantem Proteingehalt

Sowohl 8 Sorvall- als auch 8 Wassermannröhrchen mit je 2,5 g Organhomogenat bzw. 2,5 ml Phosphatpufferlösung wurden in gleicher Reihenfolge mit jeweils 100 µl Antibiotikalösung verschiedener Endkonzentration versetzt. Die mit Antibiotikum versetzten Homogenat- und Phosphatpufferröhrchen wurden sofort auf einem Rotationsmischer gut gemsicht und danach im Eisbad aufbewahrt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Homogenat-Röhrchen aus dem Eisbad genommen und bei einer Temperatur von 4°C und 49.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden abgehoben, in sterile Wassermannröhrchen gefüllt und den jeweiligen im Eisbad verbliebenen Phosphatpufferröhrchen zugeordnet.

Anschliessend wurden je 100 µl der Homogenatüberstände bzw. der Antibiotika-Phosphatpufferlösung in randomisierter Reihenfolge auf die Loch-Agar-Platten aufgetragen.

Die Antibiotikakonzentration der Homogenatüberstände wurde nach 18-stündigem Bebrüten und anschliessendem Ausmessen der Hemmhöfe mittels linearer Regression aus den Endkonzentrationen der Antibiotika-Phosphatpufferlösungen ermittelt.

2.16. Rückgewinnung eines Antibiotikums aus Organhomogenaten in Abhängigkeit vom eingesetzten Proteingehalt bei konstanter Antibiotikakonzentration und konstanter Inkubationszeit (Eisbad)

In 8 Sorvallröhrchen wurden unterschiedliche Mengen (0,5 - 5,0 g) Organhomogenat gegeben und anschliessend mit Phosphatpuffer bis zu einem Endgewicht von jeweils 5 g aufgefüllt. Sämtliche Röhrchen wurden mit 100 µl Antibiotikalösung gleicher Endkonzentration versetzt, gut geschüttelt und danach im Eisbad aufbewahrt. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Homogenatröhrchen aus dem Eisbad genommen und für 30 min und 49.000 x g bei 4°C zentrifugiert. Anschliessend wurden die Überstände abgehoben, in sterile Wassermannröhrchen gegeben und jeweils 100 µl in randomisierter Reihenfolge auf die Loch-Agar-Platten aufgetragen.
Nach 18-stündigem Bebrüten und anschliessendem Ausmessen der Hemmhöfe erfolgte die Antibiotikakonzentrationsbestimmung der Homogenatüberstände mittels linearer Regression aus den mitgeführten Phosphatpufferstandardwerten.

2.17. Rückgewinnung eines Antibiotikums aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Zeit einer Inkubation (37°C) bei konstanter Antibiotikakonzentration und konstantem Proteingehalt

Von 16 Sorvallröhrchen wurden 8 mit je 2,5 g Organhomogenat und weitere 8 mit je 2,5 ml Phosphatpuffer beschickt. Nach 2-minütiger Vorinkubation im Schüttelwasserbad bei 37°C wurden zu jedem Homogenat- und Phosphatpufferröhrchen 100 µl Antibiotikalösung gleicher Konzentration gegeben. Die mit Antibiotikalösung versetzten Homogenat- und Phosphatpufferröhrchen wurden sofort auf einem

Rotationsmischer gut gemischt und anschliessend im Schüttelwasserbad erneut bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf von 5, 10, 60, 120, 180, 240, 300 und 360 min wurden jeweils ein Homogenat- und ein Phosphatpufferröhrchen dem Schüttelwasserbad entnommen und im Eisbad rasch abgekühlt. Das jeweilige Homogenatröhrchen wurde anschliessend bei einer Termperatur von 4°C bei 49.000 x g 30 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde mit einer sterilen Psteur-Pipette der Überstand in ein steriles Wassermannröhrchen gefüllt und dem jeweiligen im Eisbad aufbewahrten Phosphatpufferröhrchen zugeordnet.

Nachdem sämtliche inkubierten Antibiotika-Phosphatpuffer und Homogenatüberstände vorlagen, wurde die Antibiotikakonzentrationsbestimmung durchgeführt.

Hierbei wurden jeweils 100 µl der Homogenatüberstände bzw. der Antibiotika-Phosphatpufferlösung in randomisierter Reihenfolge auf die Loch-Agar-Platten aufgetragen. Zusätzlich wurden auf jeder Platte Standardkonzentrationen des Antibiotikums mitgeführt, die dann nach 18-stündiger Bebrütung eine Errechnung der wiedergewonnenen Antibiotikakonzentration mittels linearer Regression ermöglichten.

Eine Wiederholung der gleichen Versuchsanordnung bei Inkubationstemperaturen von 20 und 30°C wurde dann durchgeführt, wenn die Wiedergewinnungsraten bei der Inkubationstemperatur von 37°C deutlich reduziert waren.

2.18. Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt aller Organhomogenate und Homogenatüberstände nach Zentrifugation wurde mit der von Lowry

beschriebenen Methode (Lowry et al., 1951) gegen einen Standard aus Rinderalbumin ermittelt.

Zur Proteinbestimmung wurden 2 Lösungen erstellt,

Lösung 1: 20,0 g Na_2Co_3
4,0 g NaOH
0,23 g $C_4H_4Na_2O_6 \times H_2O$
1000 ml H_2O

Lösung 2: 0,50 g $CuSO_4 \times H_2O$
100 ml H_2O

die unmittelbar vor der Messung miteinander im Verhältnis 1 (Lösung 2) : 51 (Lösung 1) vermischt und mit Fiolin Ciocalteau Phenolreagenz, welches mit Aqua destillata im Verhätlnis 1 : 1,4 verdünnt war, versetzt.

Das Probenvolumen aus den Organhomogenaten bzw. den Homogenatüberständen betrug jeweils 10 µl. Die Ansätze wurden drei- bis fünffach durchgeführt.

Wegen des hohen Proteingehaltes der Organhomogenate (Verdünnung 1 : 2) und damit auch der Überstände mussten alle Proben vor der Messung verdünnt werden, um dann bei einer jeweiligen Proteinkonzentration von 1,5 bis 20 mg/ml eine lineare Beziehung zwischen Extinktionskurve und Proteinkonzentration zu erzielen.

Die photometrische Messung wurde mit einem Spektralphotometer (PMQ 3, Zeiss, Oberkochen, Küvetten Nr. 100 - OS) bei 660 nm durchgeführt (Kling, 1969).

2.19. Sterilitätskontrollen

Um eine bakterielle Kontamination der Organhomogenate bzw. deren Überstände nach Zentrifugation auszuschliessen, wurden von allen Proben Kulturen auf Blut- und Bitter-Neu-

Agar-Platten angelegt. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C konnten verunreinigte Platten erkannt und anschliessend von der Auswertung ausgeschlossen werden.

3. Ergebnisse

3.1. Eichkurven

Im Agardiffusionstest besteht für jedes Antibiotikum in einem definierten Konzentrationsbereich zwischen dem Hemmhofdurchmesser und dem dekadischen Logarithmus der eingesetzten Konzentration eine lineare Abhängigkeit. Zur Bestimmung dieses Konzentrationsbereiches wurden von allen in dieser Arbeit untersuchten Antibiotika Eichkurven erstellt.

In der Abbildung 2 sind die aus je 6 Ansätzen gefundenen Mittelwerte der Hemmhofdurchmesser (mm) gegen den Logarithmus der entsprechenden Antibiotika-Konzentration (µg/ml) aufgetragen. Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurde ein Teil der jedoch später in die Regressionsberechnung miteinbezogenen Messwerte nicht eingezeichnet.

Für alle Antibiotika konnte bei der durchgeführten Regressionsanalyse im untersuchten Konzentrationsbereich ein linearer Verlauf der Eichkurven beobachtet werden. Die Spanne der eingesetzten Konzentrationen lag für Rifampicin zwischen 0,5 und 10,0 µg/ml (Testkeim Sarcinea lutea), für Cephacetril zwischen 1,0 und 20,0 µg/ml und für Cefotaxim zwischen 3,3 und 50,0 µg/ml (Testkeim jeweils Bacillus subtilis). Der Korrelationskoeffizient r, als Mass für den Zusammenhang zwischen Hemmhofdurchmesser und eingesetzter Konzentration, lag in allen Ansätzen bei Werten höher als 0,990.

Die statistischen Daten zu den Regressionsanalysen sind der Tabelle 2 zu entnehmen.

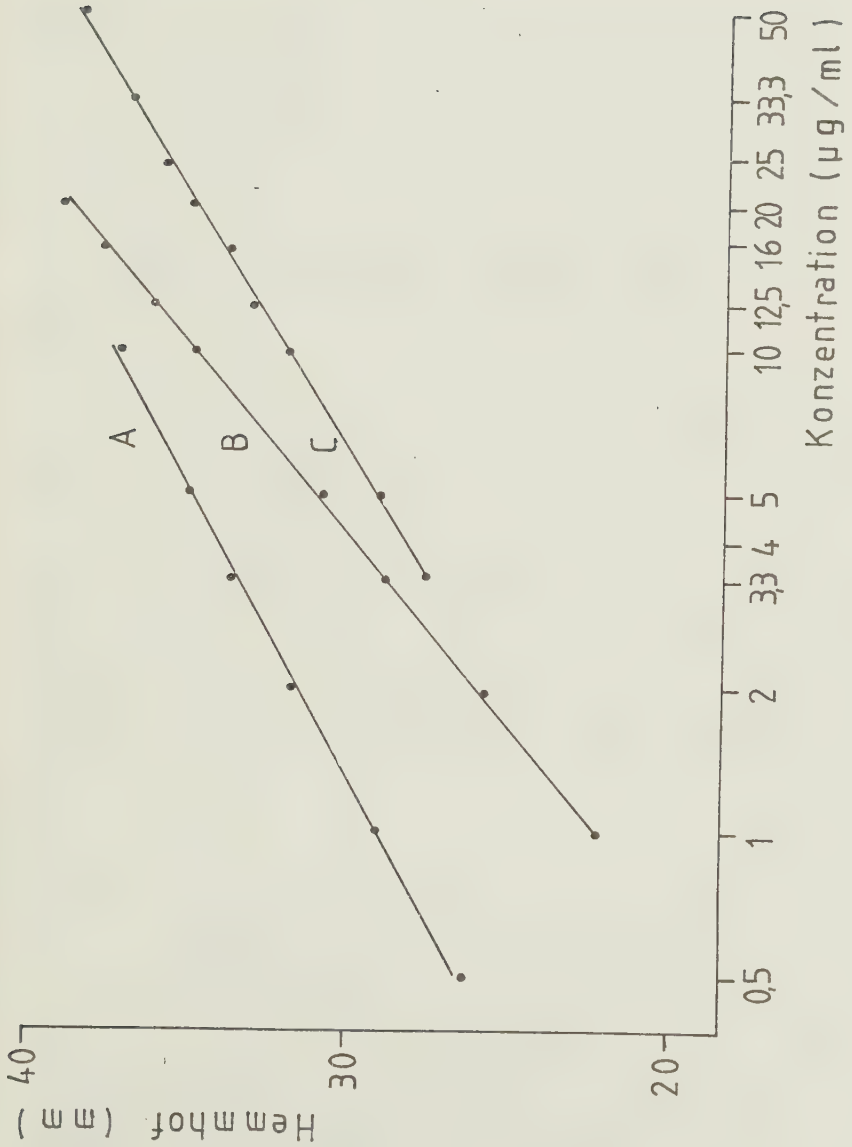


Abbildung 2: Eichkurven der Antibiotika beim Agar-Platten-Diffusionstest.

A: Rifampicin, B: Cephacetril, C: Cefotaxim

Substanz	Regressionsgleichung	r	s_{max} (mm)
Cefotaxim	y = 9,6 log 10x + 22,5	0,9968	0,6
Cephacetril	y = 12,5 log 10x + 22,0	0,9990	0,5
Rifampicin	y = 8,3 log 10x + 29,1	0,9913	0,5

Tabelle 2: Statistische Daten zur Regressionsanalyse

(r bezeichnet den Korrelationskoeffizienten der zugehörigen Funktion, s_{max} gibt die jeweils grösste Standardabweichung der zugehörigen Eichkurve an).

Die Regressionsgerade liefert ausserdem die Kriterien zur Abgrenzung von empfindlichen und weniger empfindlichen Stämmen, da an ihr die Mindestgrösse der zu fordernden Hemmhofdurchmesser abgelesen werden kann.

Sarcinea lutea war gegenüber Rifampicin deutlich empfindlicher als Bacillus subtilis gegenüber Cefotaxim und Cephacetril; für Cephacetril wiederum konnte eine höhere Senibilität als gegenüber Cefotaxim nachgewiesen werden. Entsprechend wurden in den folgenden Untersuchungen Rifampicin jeweils mit einer Endkonzentration von 8,0 µg/ml, Cephacetril mit einer Endkonzentration von 20,0 µg/ml und Cefotaxim mit einer Endkonzentration von 50,0 µg/ml eingesetzt.

3.2. Rückgewinnung der Antibiotika aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Homogenatpräparation

Die Wiedergewinnungsraten von Antibiotika aus Organhomogenaten sollten in Abhängigkeit von deren Aufbereitung untersucht werden. Hierzu wurden die mit Antibiotika versetzten Homogenate bei 2.680 x g, 49.000 x g und 100.000 x g zentrifugiert und anschliessend die Restaktivitäten sowohl der Gesamthomogenate als auch der jeweiligen Überstände bestimmt.

Die für Cefotaxim, Cephacetril und Rifampicin gefundenen Wiedergewinnungsraten sind den Abbildungen 3 bis 5 zu entnehmen. Als Bezugsgrösse zum jeweiligen Aktivitätsverlust sind hierbei die mit aufgetragenen Rückgewinnungsquoten der entsprechenden Antibiotika-Pufferlösungen zu verstehen.

Die wiedergefundenen Aktivitäten nahmen für alle Antibiotika in der Reihenfolge Gesamthomogenat, Überstand nach Zentrifugation bei 2.680 x g, 49.000 x g und 100.000 x g zu.

In Tabelle 3 sind die Antibiotika-Restaktivitäten in Prozent der Rückgewinnungsquoten aus den dazugehörigen Pufferlösungen zu ersehen.

Substanz	Gesamthomogenat	Überstand 2.680 x g	Überstand 49.000 x g	Überstand 100.000 x g	Organ
Cefotaxim	37,8	45,7	54,6	55,1	Leber
	38,0	47,0	56,0	55,9	Niere
	41,4	50,3	58,5	58,9	Lunge
Cephacetril	15,5	16,7	21,5	21,4	Leber
	17,5	21,2	26,2	26,6	Niere
	19,0	21,7	31,6	31,2	Lunge
Rifampicin	22,8	30,0	30,6	37,7	Leber
	27,0	37,9	39,9	46,1	Niere
	19,9	37,1	39,1	48,9	Lunge

Tabelle 3: Rückgewinnungsquoten der Antibiotika in Abhängigkeit von der Homogenatpräparation.

Die Rückgewinnungsquoten sind in Prozent der Wiedergewinnungsraten aus den dazugehörigen Pufferlösungen (100%) aufgelistet.

Die wiedergefundenen Restaktivitäten, bezogen auf die jeweiligen Pufferlösungen, lagen je nach untersuchtem Antibiotikum in den Gesamthomogenaten zwischen 15,5 und 41,4%, in den Überständen nach Zentrifugation bei 2.680 x g

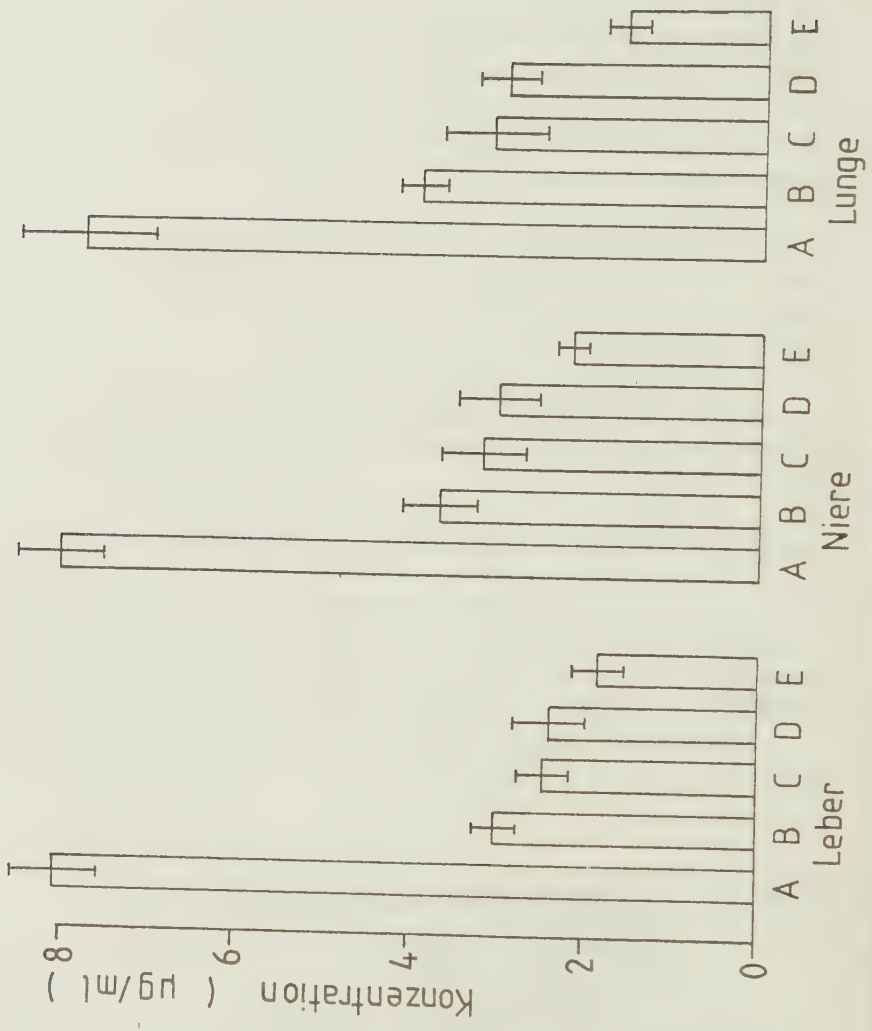


Abbildung 3: Rückgewinnung von Rifampicin aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Aufbereitung der Überstände in verschiedenen Zentrifugen.

A: Puffer, B: Überstand nach 100.000 x g, C: Überstand nach 49.000 x g, D: Überstand nach 2.680 x g, E: Gesamthomogenat

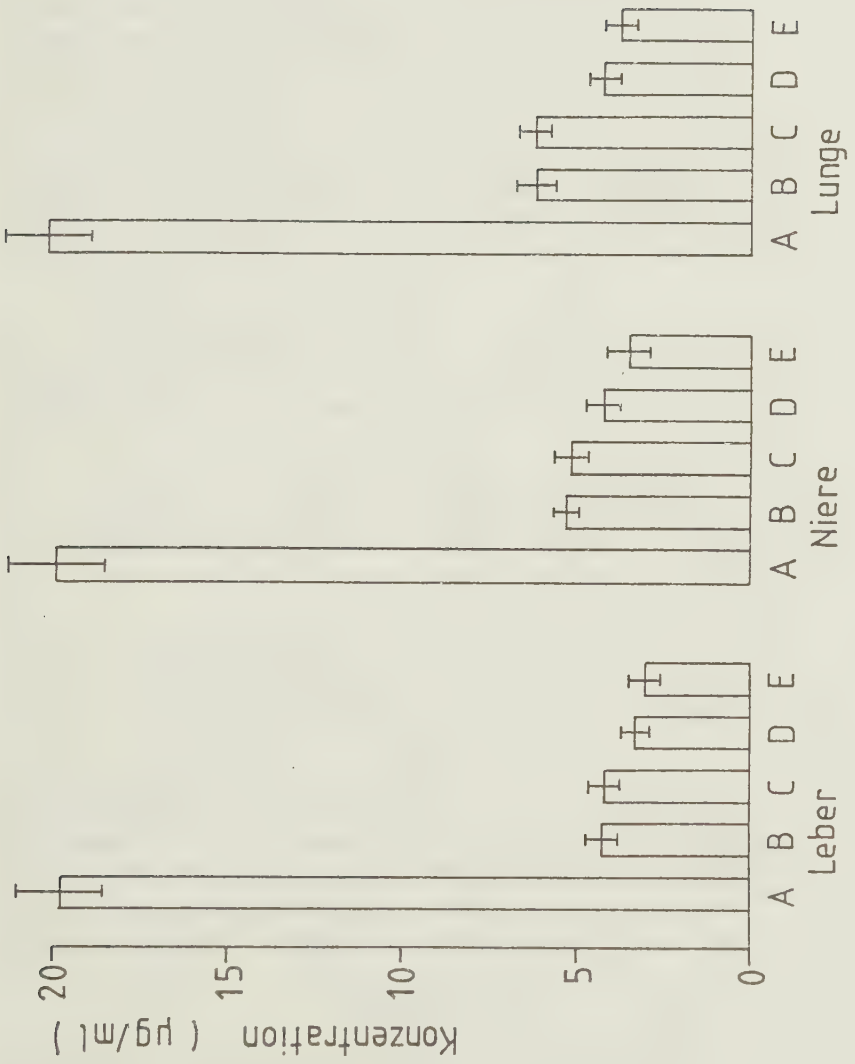


Abbildung 4: Rückgewinnung von Cephacetril aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Aufbereitung der Überstände in verschiedenen Zentrifugen.

A - E: wie Abbildung 3

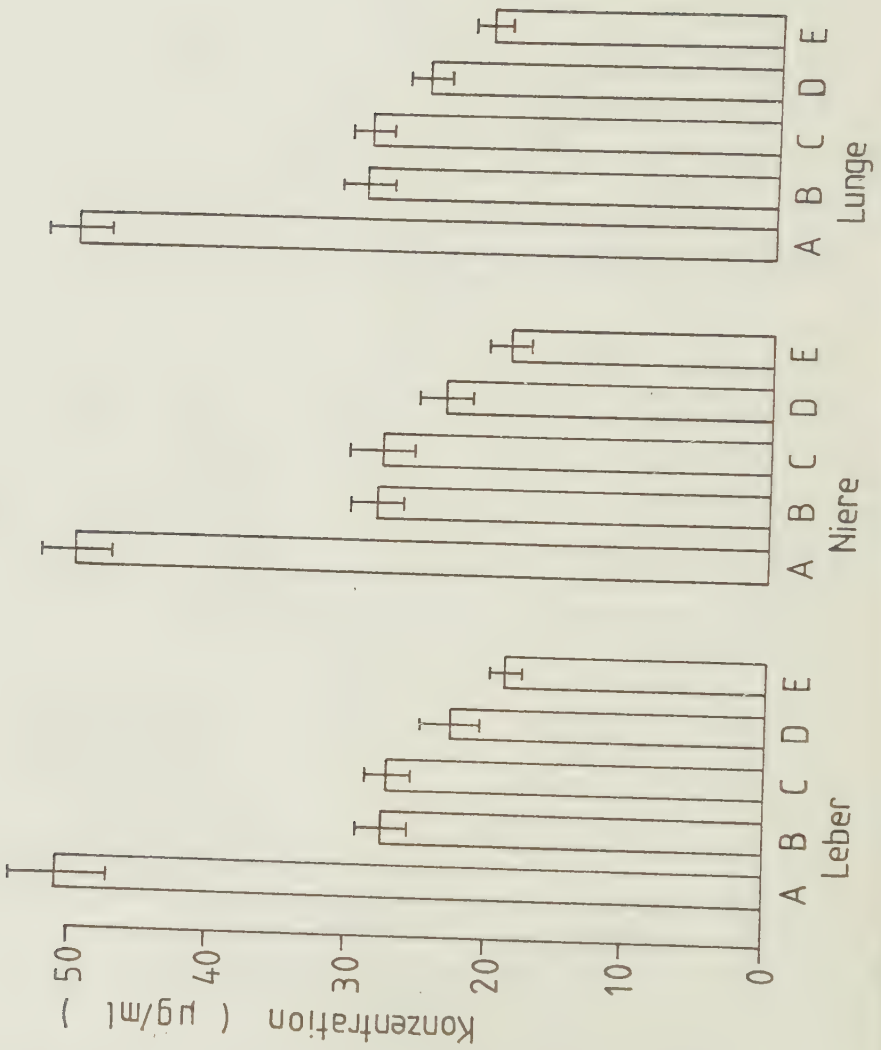


Abbildung 5: Rückgewinnung von Cefotaxim aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Aufbereitung der Überstände in verschiedenen Zentrifugen.

A - E: wie Abbildung 3

zwischen 16,7 und 50,3%, in den Überständen nach Zentrifugation bei 49.000 x g zwischen 21,5 und 58,5% und in den Überständen nach Zentrifugation bei 100.000 x g zwischen 21,4 und 58,9%. Für Cefotaxim und Cephacetril konnte nach Zentrifugation bei 100.000 x g im Vergleich zu derjenigen bei 49.000 x g keine signifikante Erhöhung der Antibiotika-Ausbeute beobachtet werden. Im Gegensatz dazu lag für Rifampicin die durchschnittliche Rückgewinnungsrate nach Zentrifugation bei 100.000 x g um ca. 7,5% über derjenigen bei 49.000 x g.

Der Proteingehalt der Gesamthomogenate und der verschiedenen Homogenatüberstände ist in Tabelle 4 aufgeführt:

Organ	Gesamt-homogenat	Überstand 2.680 x g	Überstand 49.000 x g	Überstand 100.000 x g
Leber	54,1 ± 3,4	50,2 ± 3,3	34,7 ± 2,6	34,3 ± 1,4
Niere	49,1 ± 3,2	39,1 ± 2,7	31,5 ± 2,4	30,1 ± 1,7
Lunge	47,7 ± 2,6	40,8 ± 3,9	30,2 ± 1,8	39,7 ± 0,5

Tabelle 4: Proteingehalt der Gesamthomogenate und der Überstände nach verschiedener Zentrifugation. Alle Angaben in mg/ml.

Der Proteingehalt im Gesamthomogenat und in den Proben nach Zentrifugation bei 2.680 x g, 49.000 x g und 100.000 x g nahm fortschreitend ab. Für alle Homogenatüberstände konnte nach Zentrifugation bei 100.000 x g im Vergleich zu derjenigen bei 49.000 x g nur eine geringe Erniedrigung des Proteingehaltes beobachtet werden.

3.3. Rückgewinnung der Antibiotika aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der eingesetzten Antibiotikakonzentration

Pufferlösungen sowie Leber-, Nieren- und Lungenhomogenate wurden mit unterschiedlichen Antibiotika-Endkonzentrationen versetzt, um nach 30-minütiger Inkubation im Eisbad die jeweiligen Wiedergewinnungsraten zu bestimmen.

Durch die Kühlung im Eisbad wurde ein möglicher rascher Abbau der Antibiotika verhindert, so dass der zeitunabhängige Wirkungsverlust, z.B. durch Bindung an Proteine, Mucopolysaccharide und sonstige Gewebebestandteile in Abhängigkeit von der eingesetzten Antibiotika-Endkonzentration berechnet werden konnte.

In den Abbildungen 6 bis 8 sind die im Agardiffusionstest erhaltenen Hemmhofdurchmesser (mm) der Homogenatüberstände und Pufferlösungen gegen die dazugehörigen Antibiotika-Endkonzentrationen(µg/ml) aufgetragen.

Im untersuchten Konzentrationsbereich fand sich für alle Antibiotika eine lineare Beziehung zwischen der Grösse der wiedergefundenen Hemmhofdurchmesser in Abhängigkeit von der eingesetzten Antibiotika-Endkonzentration. Die Differenz zwischen dem Durchmesser der Pufferhemmhöfe und den entsprechenden Homogenathemmhöfen ist hierbei als Grösse des jeweiligen Aktivitätsverlustes zu verstehen.

In den Abbildungen 9 bis 11 sind die aus den Organhomogenaten wiedergefundenen Antibiotikaaktivitäten in Prozent der jeweiligen Ausgangskonzentration gegen die eingesetzte Endkonzentration aufgetragen.

Für Cefotaxim, Cephacetril und Rifampicin konnte in allen

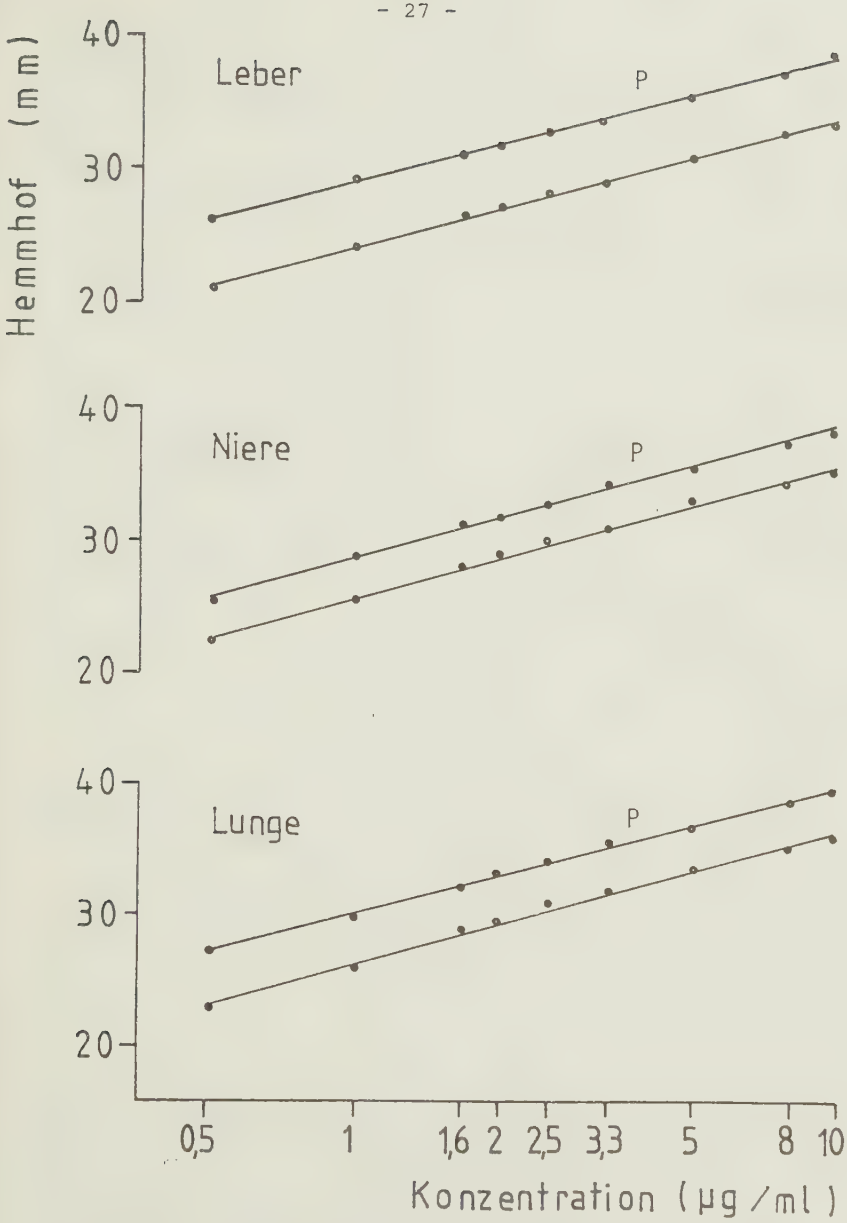


Abbildung 6: Abhängigkeit der Rückgewinnung von Rifampicin aus Organhomogenaten und Phosphat-Pufferlösungen von der jeweils eingesetzten Rifampicin-Endkonzentration.

P beschreibt jeweils die Veränderung der Hemmhofdurchmesser in Rifampicin-Pufferlösung.

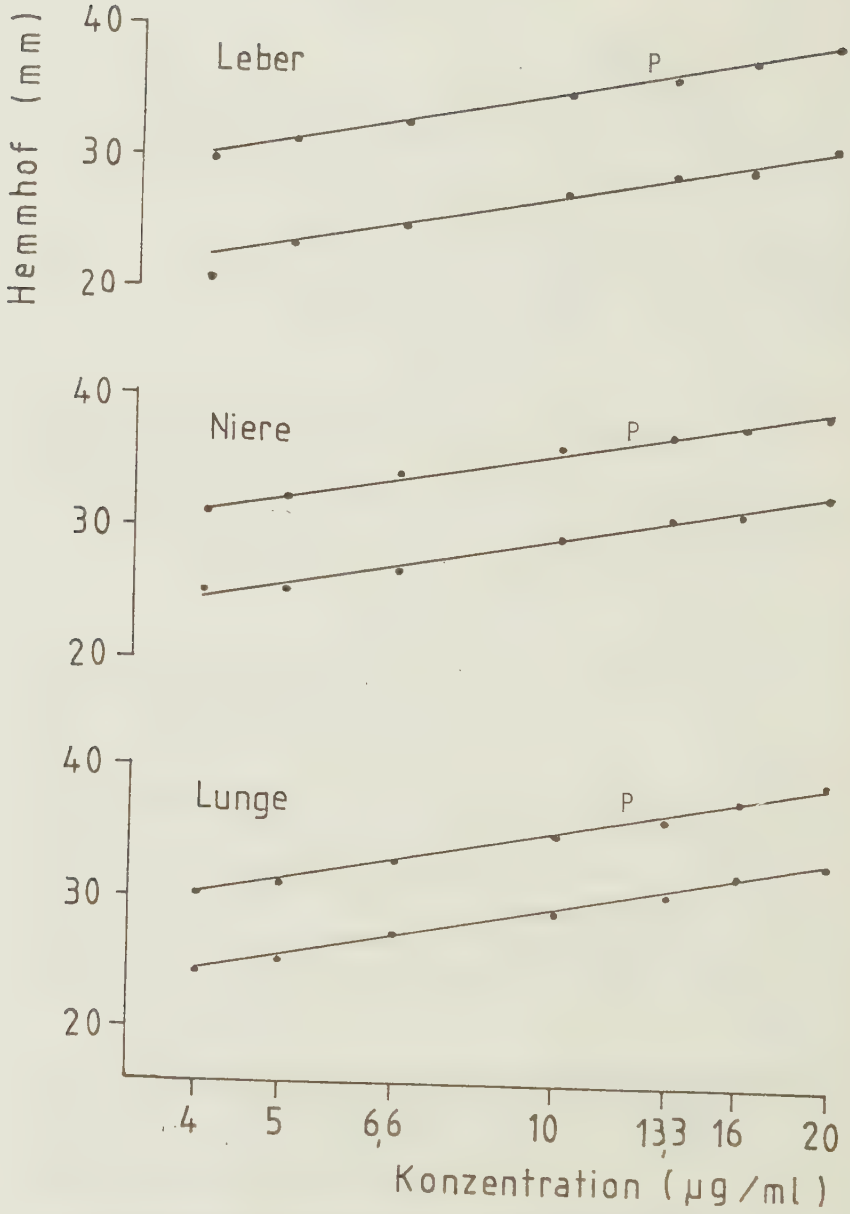


Abbildung 7: Abhängigkeit der Rückgewinnung von Cephacetril aus Organhomogenaten und Phosphat-Pufferlösungen von der jeweils eingesetzten Cephacetril-Endkonzentration (vgl. Abb. 6).

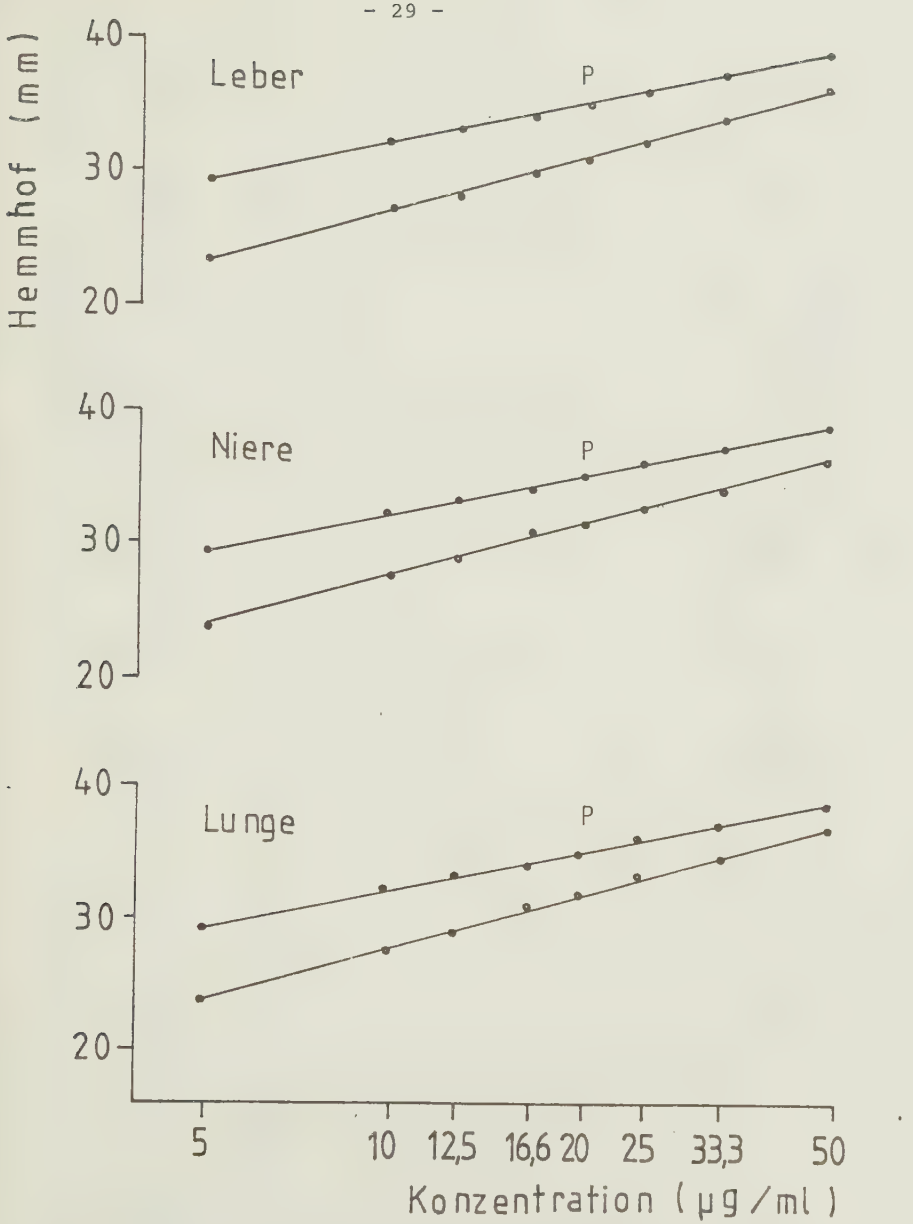


Abbildung 8: Abhängigkeit der Rückgewinnung von Cefotaxim aus Organhomogenaten und Phosphat-Pufferlösungen von der jeweils eingesetzten Cefotaxim-Endkonzentration (vgl. Abb. 6).

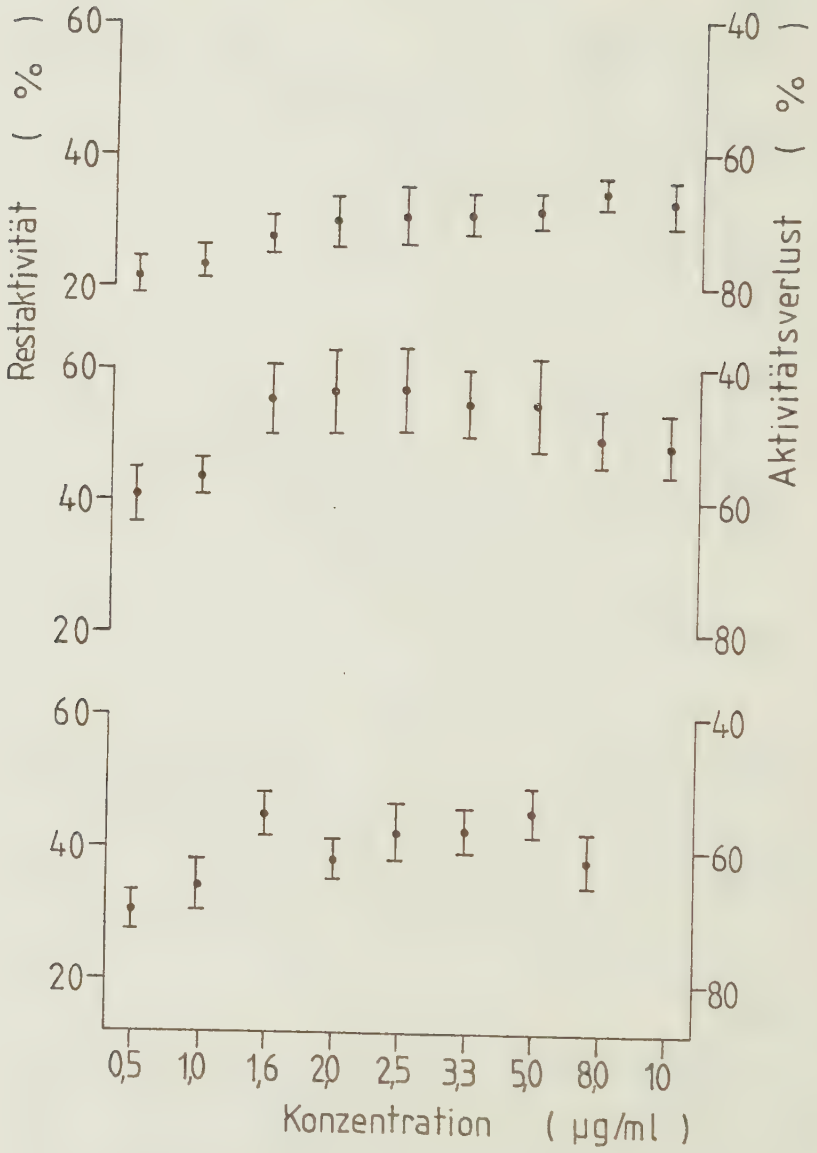


Abbildung 9: Abhängigkeit der Aktivitätsverluste von Rifampicin in Organhomogenaten von der eingesetzten Endkonzentration nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C.

Abszisse: Ausgangskonzentration (µg/ml)
Ordinate: Restaktivität bzw. Aktivitätsverlust in Prozent, bezogen auf die entspr. Werte in Pufferlösung (100 bzw. 0%).

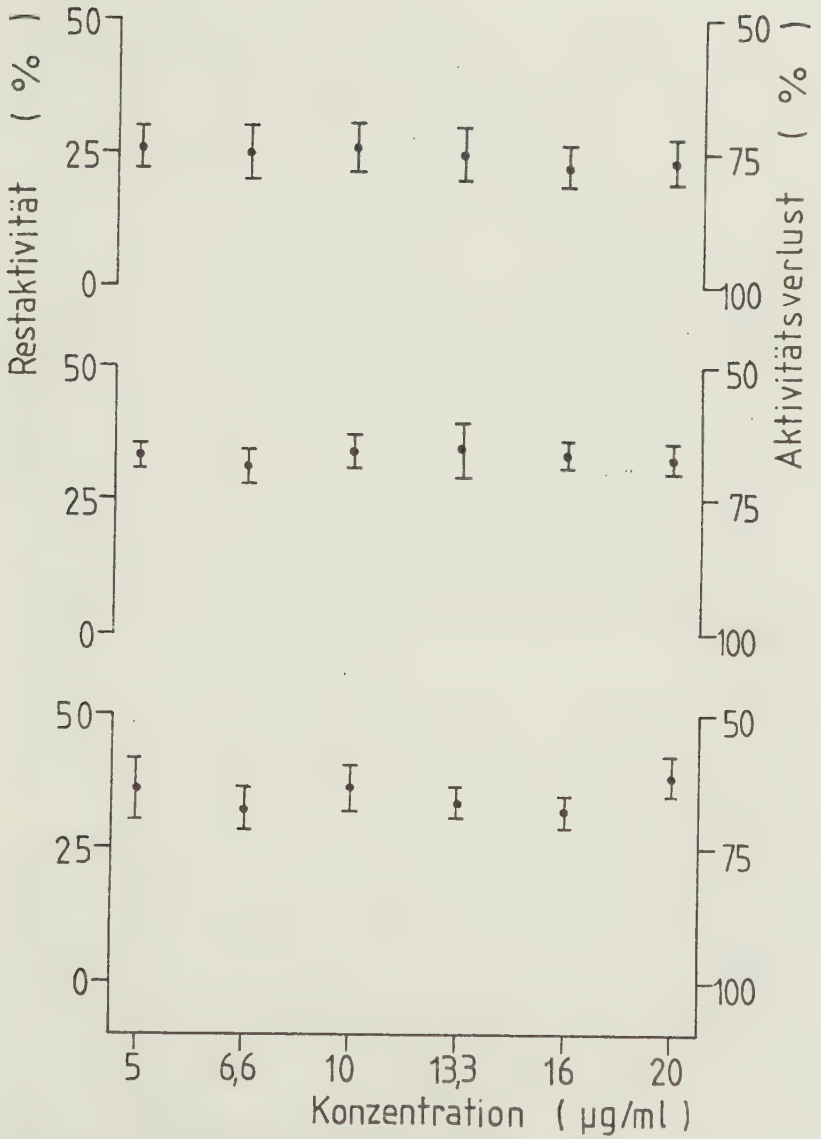


Abbildung 10: Abhängigkeit der Aktivitätsverluste von Cephacetril in Organhomogenaten von der eingesetzten Endkonzentration nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C (vgl. Abb. 9).

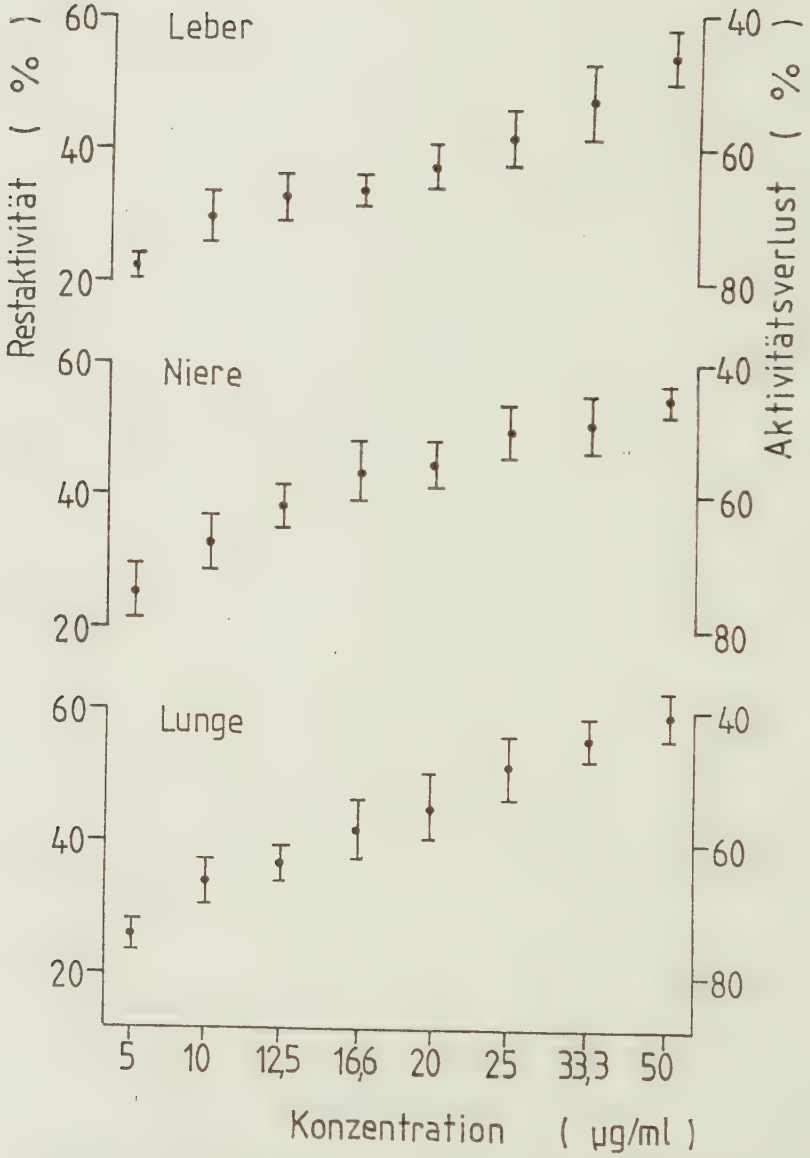


Abbildung 11: Abhängigkeit der Aktivitätsverluste von Cefotaxim in Organhomogenaten von der eingesetzten Endkonzentration nach 30-minütig Inkubation bei 4°C (vgl. Abb. 9).

Organhomogenaten gegenüber den jeweils eingesetzten Konzentrationen ein Aktivitätsverlust nachgewiesen werden. Die aus den Leberhomogenaten wiedergefundene Restaktivität war für sämtliche Antibiotika deutlich niedriger als die aus den Nieren- und Lungenhomogenaten.

Für Cephacetril und Rifampicin konnte keine Änderung der prozentualen Rückgewinnungsquoten in Abhängigkeit von der jeweils eingesetzten Endkonzentration beobachtet werden. Die mittlere Wiedergewinnungsrate lag für Cephacetril je nach untersuchtem Organhomogenat zwischen 25,0 und 35,0% und für Rifampicin zwischen 29,9 und 52,0%. Für Cefotaxim konnte in allen Organhomogenaten eine Zunahme der Rückgewinnungsrate in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration gefunden werden. Bei einer eingesetzten Dosis von 5 µg/ml fand sich je nach Organhomogenat eine Restaktivität zwischen 22,5 und 26,9%, die sich bei einer Dosis von 50 µg/ml bis auf 54,0 bzw. 58,9% steigerte.

3.4. Rückgewinnung der Antibiotika aus Organhomogenaten in Abhängigkeit vom Proteingehalt der Proben

Die Wiedergewinnungsraten von Antibiotika aus Organhomogenaten sollten in Abhängigkeit von deren Gewebehomogenatkonzentration untersucht werden. Hierzu wurden Leber-, Nieren- und Lungenhomogenate in mehreren Stufen mit Phosphatpuffer verdünnt (Verdünnung 1 : 10 bis 1 : 2, entsprechend einem Homogenatanteil von 5 bis 50%) und anschliessend mit Antibiotika-Lösungen gleicher Endkonzentrationen versetzt.

In den Abbildungen 12 bis 14 sind die wiedergefundenen Aktivitäten in Prozent der eingesetzten Antibiotika-Endkonzentration gegen den Grad der Verdünnung aufgetragen.

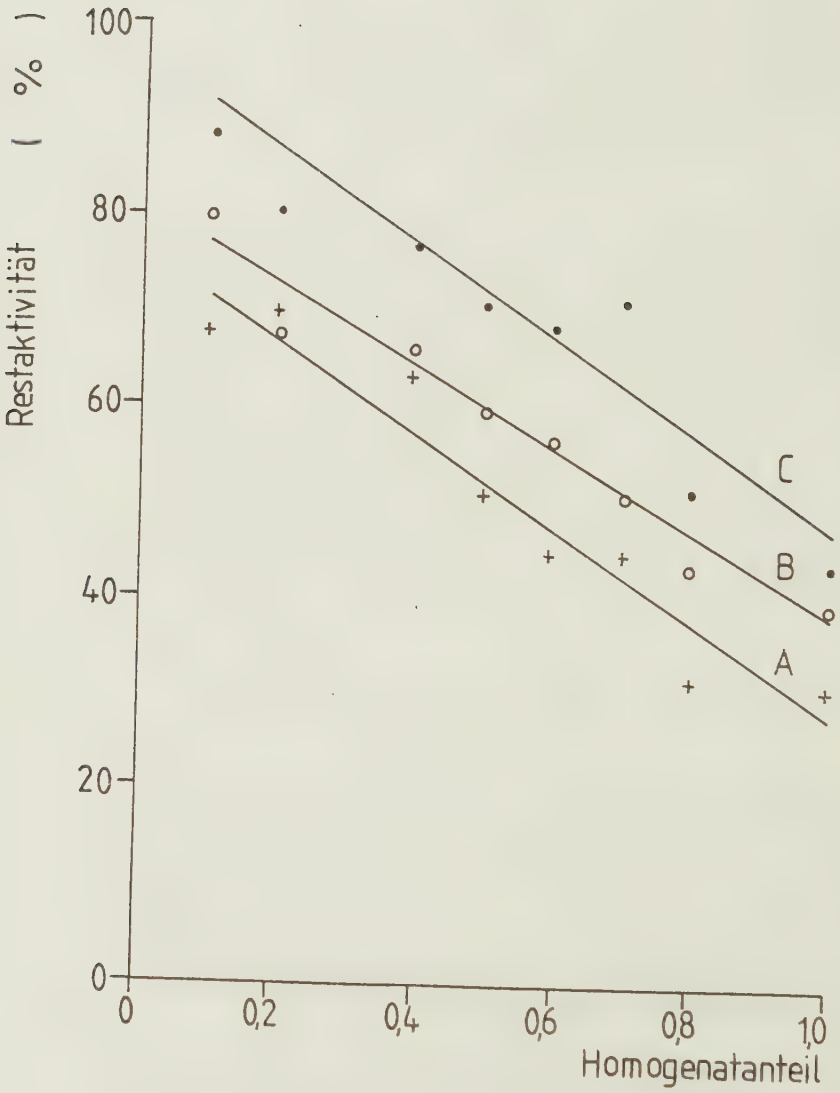


Abbildung 12: Rückgewinnung von Rifampicin aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Homogenatverdünnung.

Abszisse: Homogenatanteil (1,0 ≙ einem 50%igen Stammhomogenat; 0,2 ≙ einer 5%igen Homogenatverdünnung).
Ordinate: Restaktivität in Prozent, bezogen auf die eingesetzte Endkonzentration (100%).
A: Leber, B: Niere, C: Lunge

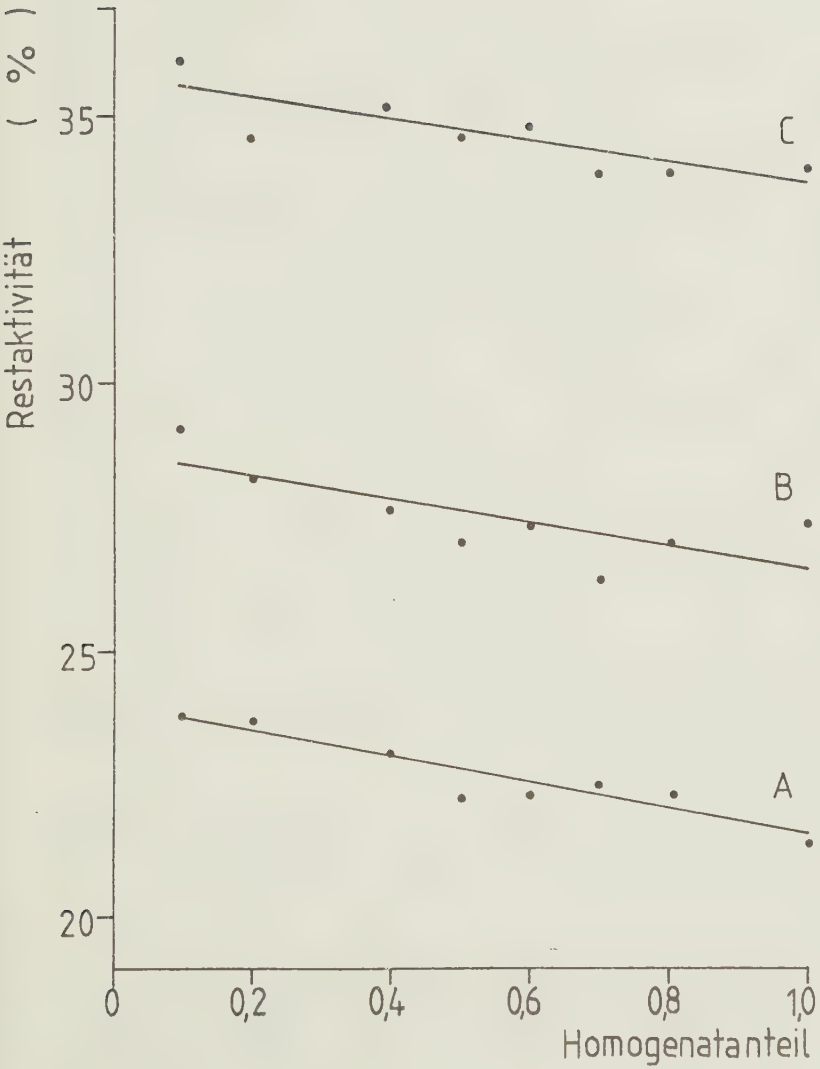


Abbildung 13: Rückgewinnung von Cephactril aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Homogenatverdünnung (vgl. Abb. 12).

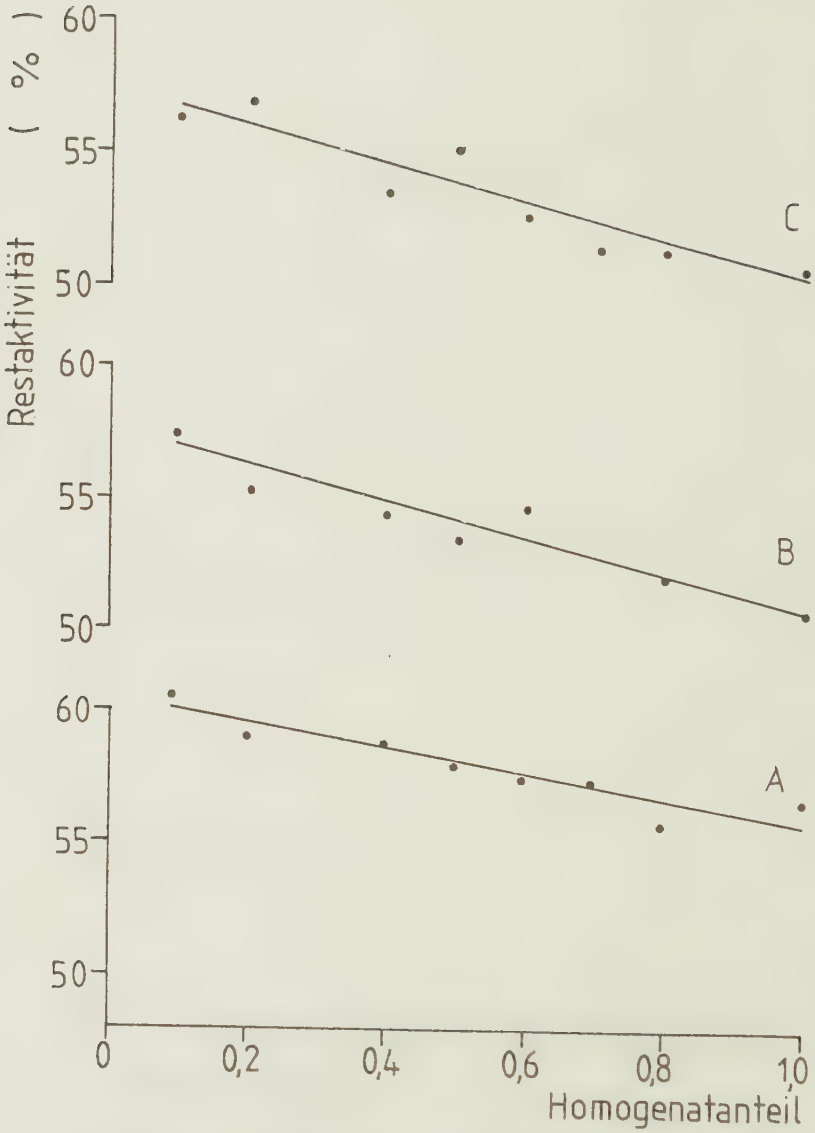


Abbildung 14: Rückgewinnung von Cefotaxim aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Homogenatverdünnung (vgl. Abb. 12).

Für Cephacetril und Cefotaxim konnte in den Überständen keine signifikante Änderung der gefundenen Aktivitäten in Abhängigkeit vom Grad der Verdünnung nachgewiesen werden. Die für beide Antibiotika in 5%igen Homogenaten gering erhöhte Ausbeute, je nach Organ zwischen 1,7 und 2,8%, gegenüber denjenigen von 50%igen Homogenaten liegt im Bereich der Streuung der Messmethode. Im Gegensatz dazu lagen für Rifampicin die Wiedergewinnungsraten von 5%igen Homogenaten für die Leber um 36,4%, für die Niere um 39,5% und für die Lunge vum 49,9% über denjenigen von 50%igen Homogenaten.

Der Proteingehalt der jeweiligen Homogenatverdünnung ist in Tabelle 5 aufgelistet.

Leber	Niere	Lunge	Verdünnung
4,1 ± 0,2	3,8 ± 0,3	3,2 ± 0,4	5%
7,0 ± 0,5	5,9 ± 0,7	5,7 ± 0,4	10%
12,2 ± 1,0	11,4 ± 1,4	11,1 ± 1,8	20%
14,6 ± 1,9	14,6 ± 1,9	13,9 ± 1,7	25%
17,3 ± 2,5	18,3 ± 1,6	17,1 ± 2,2	30%
22,1 ± 2,9	21,4 ± 2,2	20,0 ± 1,9	35%
29,2 ± 3,0	24,5 ± 2,5	24,4 ± 2,5	40%
35,6 ± 2,6	31,3 ± 2,1	30,2 ± 1,4	50%

Tabelle 5: Proteingehalt der Homogenatüberstände in Abhängigkeit von der Gewebehomogenatkonzentration. Alle Angaben in mg/ml.

3.5. Rückgewinnung der Antibiotika aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 37°C

Eine mögliche Aktivitätsänderung der Antibiotika in Organhomogenaten von Leber, Niere und Lunge sollte zeitabhängig

bei einer Inkubationstemperatur von 37°C untersucht werden. Um eine spontan im Puffermilieu auftretende Aktivitätsänderung der Antibiotika auszuschliessen, wurden zusätzlich auch hier die jeweiligen zeitabhängigen Wiedergewinnungsraten bestimmt.

Aus den Abbildungen 15 bis 18 sind die wiedergefundenen Antibiotikaaktivitäten aus den Organhomogenaten und den entsprechenden Pufferkontrollen über einen zeitlichen Verlauf von 360 Minuten zu ersehen. Hierbei wurden die jeweils wiedergefundenen Antibiotika-Konzentrationen als Restaktivität, in Prozent der zu Beginn der Inkubationszeit nachgewiesenen Aktivität, gegen die entsprechende Inkubationszeiten in Minuten aufgetragen.

Nach 6-stündiger Inkubation konnte aus den Pufferansätzen für Cephacetril, Cefotaxim und Rifampicin gegenüber der Ausgangsaktivität keine Änderung nachgewiesen werden.

Die biologische Aktivität des Cefotaxims verminderte sich zeitabhängig im Leber- und Nierenhomogenat. Im Leberhomogenat nahm die wiedergefundene Aktivität von 67,9% nach 60 Minuten über 41,3% nach 180 Minuten bis auf 26,7% am Versuchsende nach 360 Minuten ab. Im Nierenhomogenat betrug bei gleichen Zeitintervallen die Restaktivität 71,1%, 43,4% und 32,2%. Im Lungenhomogenat konnte für Cefotaxim keine Aktivitätsänderung nachgewiesen werden.

Die biologische Aktivität von Cephacetril verminderte sich im Leberhomogenat von 83,6% nach 60 Minuten auf 62,2% nach 180 Minuten bis auf 55% nach 360 Minuten. Im Nieren- und Lungenhomogenat konnte für Cephacetril kein Aktivitätsverlust beobachtet werden.

Für Rifampicin konnte im Leber-, Nieren- und Lungenhomogenat

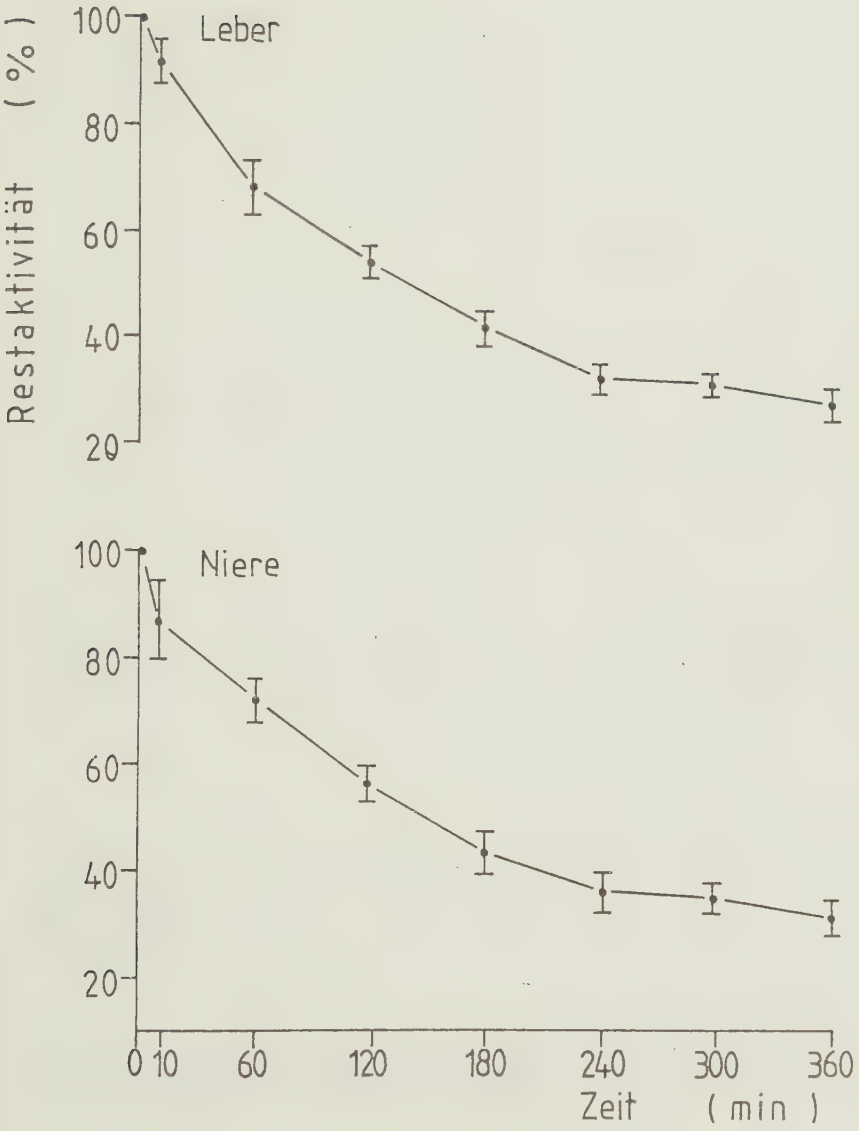


Abbildung 15: Rückgewinnung von Cefotaxim aus Organhomogenaten und Phosphatpufferlösung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 37°C.

Abszisse: Inkubationszeit in Minuten;
Ordinate: Restaktivität in Prozent bezogen auf die zu Beginn der Inkubationszeit nachweisbare Aktivität (100%).

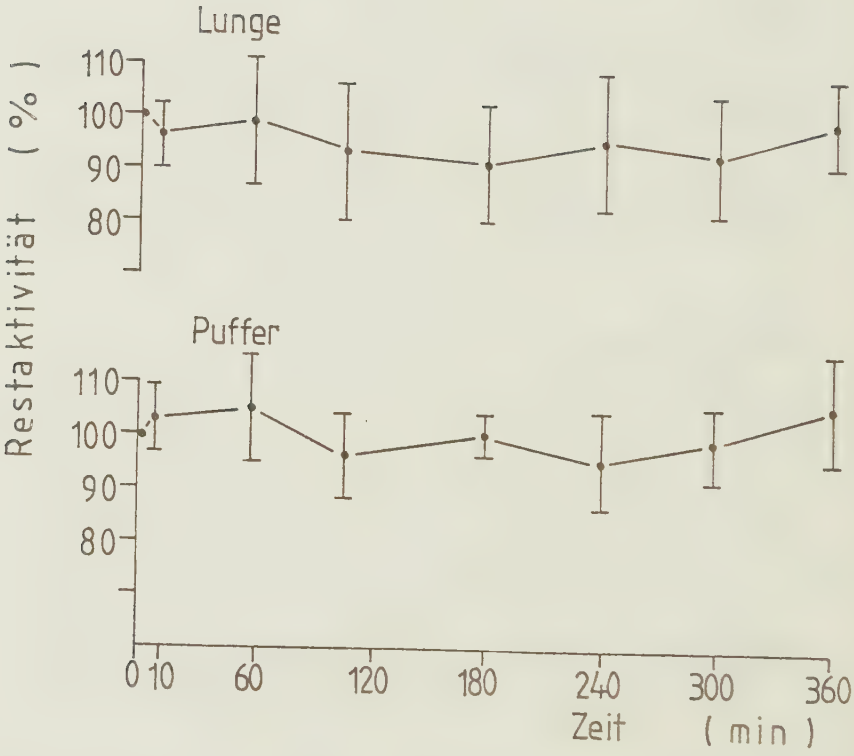


Abbildung 16: Rückgewinnung von Cefotaxim aus Organhomogenaten und Phosphatpufferlösung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 37°C (vgl. Abb. 15).

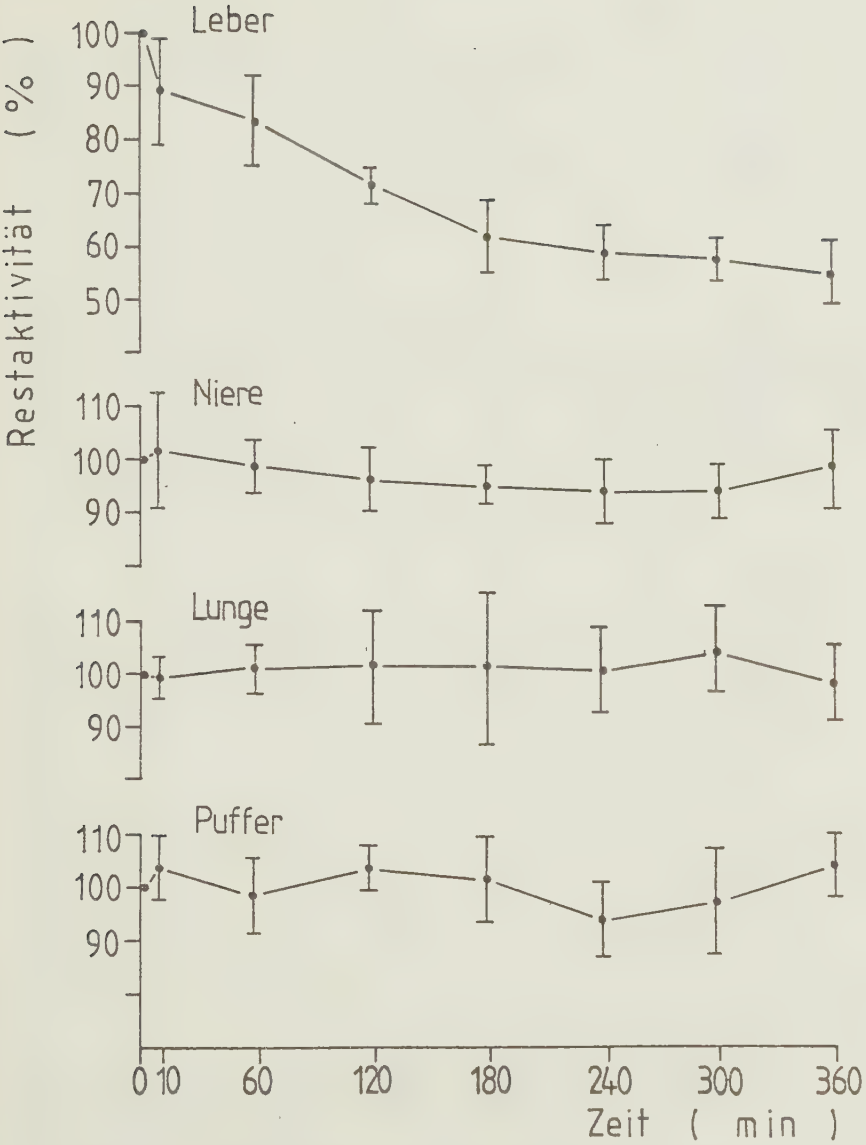


Abbildung 17: Rückgewinnung von Cephacetril aus Organhomogenaten und Phosphatpufferlösung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 37°C (vgl. Abb. 15).

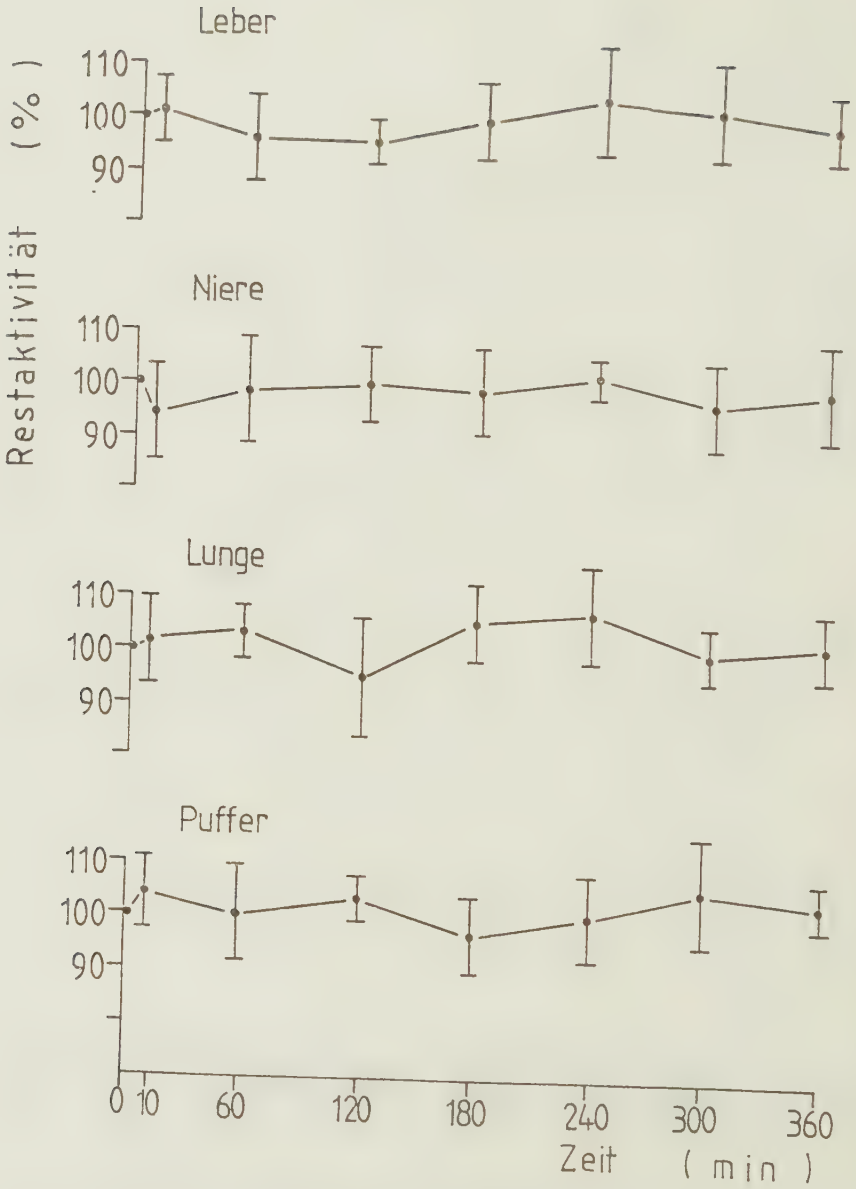


Abbildung 18: Rückgewinnung von Rifampicin aus Organhomogenaten und Phosphatpufferlösung in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 37°C (vlg. Abb. 15).

kein zeitabhängiger Wirkungsverlust festgestellt werden.

3.6. Rückgewinnung der Antibiotika aus Organhomogenaten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 20°C und 30°C

Die bei einer Inkubationstemperatur von 37°C für Cefotaxim und Cephacetril im Leber- und Nierenhomogenat gefundenen zeitabhängigen Aktivitätsverluste sollten auf eine mögliche Termperaturabhängigkeit überprüft werden. Hierzu wurden die mit Cefotaxim und Cephacetril versetzten Leber- bzw. Nierenhomogenate bei 20° und 30°C inkubiert und anschliessend die jeweiligen zeitabhängigen Wiedergewinnungsraten bestimmt.

Die bei Inkubationstemperaturen von 20°, 30° und 37°C wiedergefundenen Antibiotika-Konzentrationen von Cefotaxim und Cephacetril in Leber- bzw. Nierenhomogenaten sind in den Abbildungen 19 und 20 über einen zeitlichen Verlauf von sechs Stunden dargestellt. Die jeweiligen Aktivitäsverluste sind hierbei in Prozent der zu Beginn der Inkubationszeit nachgewiesenen Aktivität gegen die entsprechende Inkubationszeiten aufgetragen.

Für Cefotaxim und Cephacetril fanden sich bei zunehmender Inkubationstemperatur im Leber- und Nierenhomogenat steigende Aktivitätsverluste.

Bei einer Inkubationstemperatur von 20°C fand sich für Cefotaxim im Leberhomogenat nach 6 Stunden eine Restaktivität von 66,9%, bei 30°C eine Restaktivität von 43,9% und bei 37°C eine von 26,7%. Im Nierenhomogenat betrugen die wiedergefundenen Aktivitäten bei gleichen Inkubationstemperaturen 66,9%, 42,9% und 32,2%.

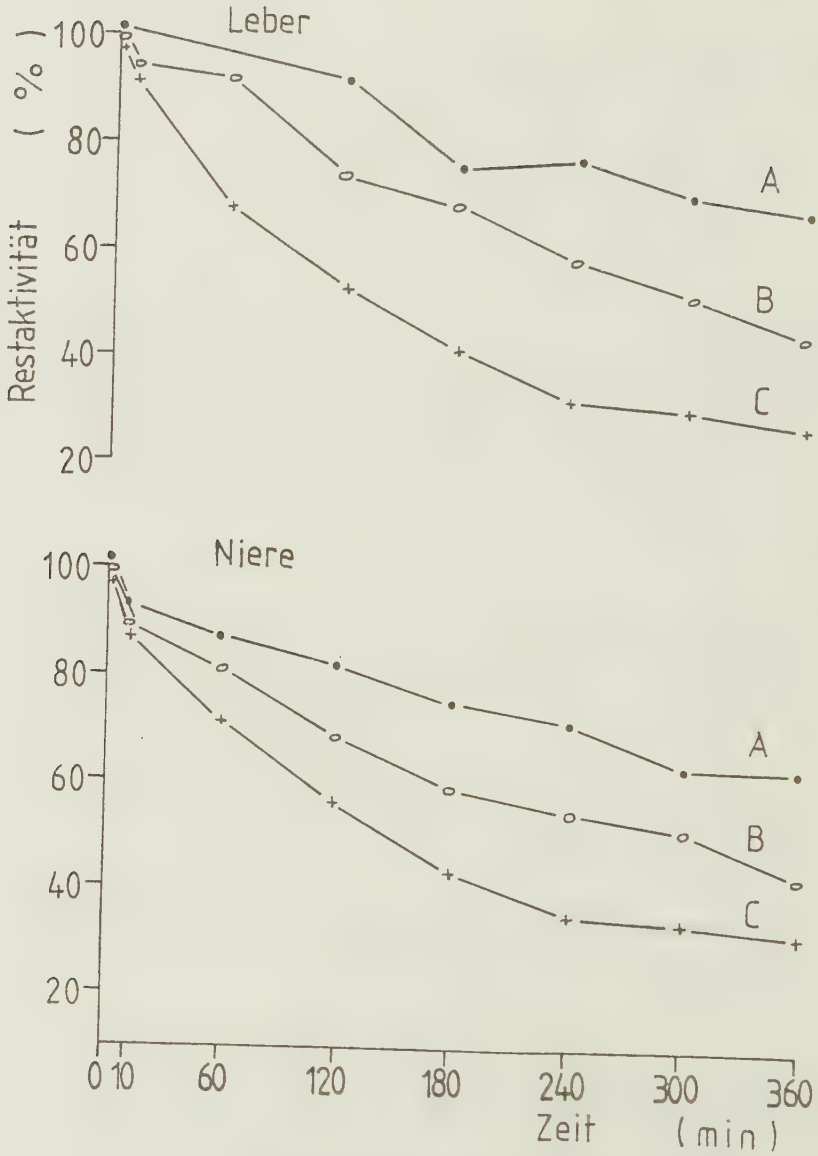


Abbildung 19: Zeitabhängige Rückgewinnung von Cefotaxim aus Leber- und Nierenhomogenaten bei Inkubationstemperaturen von 20°, 30°, und 37°C.

Abszisse: Inkubationszeit in Minuten; Ordinate: Restaktivität in Prozent bezogen auf die zu Beginn der Inkubationszeit nachweisbare Aktivität(100%)

A: Inkubation bei 20°C; B: Inkubation bei 30°C; C: Inkubation bei 37°C

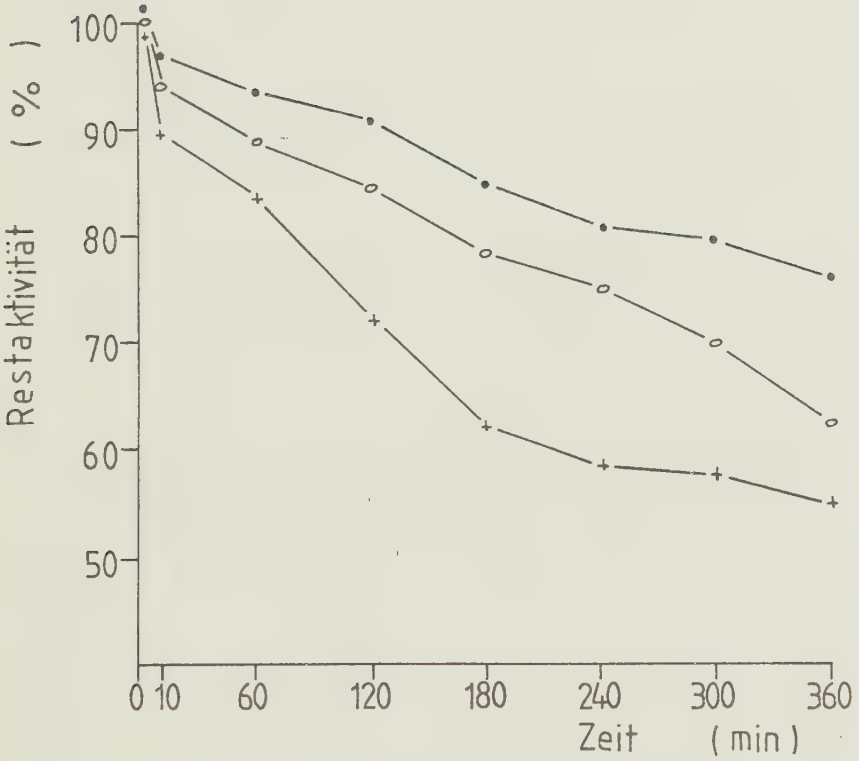


Abbildung 20: Zeitabhängige Rückgewinnung von Cephacetril aus Leberhomogenaten bei Inkubationstemperaturen von 20°C, 30°C und 37°C (vgl. Abb. 19).

Im Leberhomogenat verminderte sich die biologische Aktivität von Cephacetril nach 6-stündiger Inkubation bei 20°C auf 76,4%, bei 30°C auf 62,0% und bei 37°C auf 55,0%.

3.7. Bestimmung des Proteingehaltes der Organhomogenate und der Homogenat-Überstände nach Zentrifugation bei 49.000 x g

Um ein mittelbares Mass für die Gleichförmigkeit der Gewebehomogenate (Verdünnung 1 : 2) und der Homogenat-Überstände nach Zentrifugation bei 49.000 x g zu erhalten, wurden alle Proben auf deren Proteingehalt untersucht.

Wie aus Tabelle 6 zu ersehen ist, nahm der Proteingehalt in der Reihenfolge Leber, Niere und Lunge ab. Das Verhältnis vom Proteingehalt der Organhomogenate zum Proteingehalt der Überstände nach Zentrifugation lag für die Leber bei 1,57, für die Niere bei 1,62 und für die Lunge bei 1,56.

Organ	Homogenat	Überstand	Homogenat : Überstand
Leber	55,1 ± 3,0	34,9 ± 2,1	1,57
Niere	50,0 ± 2,8	31,4 ± 1,9	1,62
Lunge	48,0 ± 2,9	30,6 ± 2,0	1,56

Tabelle 6: Mittelwerte des Proteingehaltes der Organhomogenate und der Überstände nach Zentrifugation bei 49.000 x g (alle Angaben in mg/ml).

4. Diskussion

Konzentrationsbestimmungen von Antibiotika wurden in den vergangenen Jahren hauptsächlich in Serum und Urin vorgenommen. Um ein besseres Verständnis der pharmakokinetischen Eigenschaften der Antibiotika zu gewinnen, werden derartige Bestimmungen in zunehmendem Masse auch am Gewebe durchgeführt (Irmer et al., 1976).

In den vorliegenden in vitro-Untersuchungen wurde die Beeinflussung der messbaren Wiedergewinnungsraten dreier Antibiotika aus Organhomogenaten des Meerschweinchens in Abhängigkeit von verschiedenen experimentellen Parametern untersucht.

Die Wiedergewinnungsquote der Antibiotika änderte sich in Abhängigkeit von der Aufbereitung der Homogenate. Für alle untersuchten Antibiotika konnten im Homogenatüberstand abnehmende Aktivitätsverluste bei zunehmender Beschleunigung und Dauer der Zentrifugation festgestellt werden. Die Wiedergewinnungsrate aus den Überständen nach 10-minütiger Zentrifugation bei 2.680 x g lagen im Mittel um 7,7% und die bei 30-minütiger Zentrifugation bei 49.000 x g im Mittel um 13,2% über den aus Organhomogenaten gewonnenen. Für Cefotaxim und Cephacetril konnten nach 60-minütiger Ultrazentrifugation bei 100.000 x g im Vergleich zu derjenigen bei 49.000 x g keine Erhöhung der Antibiotikaausbeute erzielt werden. Im Gegensatz dazu lag für Rifampicin die durchschnittliche Rückgewinnungsrate bei 100.000 x g um ca. 7,5% über derjenigen bei 49.000 x g.
Gleichzeitig nahm der Proteinanteil in den Homogenatüberständen, bezogen auf den Proteingehalt der Gesamthomogenate, nach 2.680 x g um 14%, nach 49.000 x g um 36,1% und nach 100.000 x g um 37,6% ab.

In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen erzielte Peterson et al. (1977) für Cephalosporine und Aminoglykoside bei Zentrifugation menschlichen Plasmas mit 14.000 x g im Vergleich zu derjenigen mit 295.000 x g eine um ca. 6% erniedrigte Antibiotikaausbeute.

Das Wesentliche der Zentrifugation besteht darin, antibiotikahaltiges Material solange zu zentrifugieren, bis die Eiweisskörper nebst assoziiertem Arzneimittel sedimentiert sind. Es verbleibt ein weitgehendst eiweissfreier Überstand, dessen Antibiotikakonzentration dem eiweissungebundenen Anteil im Serum oder Gewebe entspricht. Voraussetzung ist, dass das untersuchte Antibiotikum selbst praktisch nicht sedimentiert, was bei den niedrigen Molekulargewichten der meisten Pharmaka der Fall ist. Ein durch die Zentrifugation bedingter Einfluss auf die Protein-Arzneimittelbindung konnte in anderen Untersuchungen ausgeschlossen werden (Chanutin et al., 1947; Büttner, 1964). Das Assoziationsgleichgewicht zwischen Arnzeimittel und Protein-Arzneimittelkomplex bleibt während der gesamten Zentrifugationsdauer in allen Kompartimenten des Zentrifugenröhrchens konstant (Büttner und Portwich, 1961).

Die unterschiedlichen Wiedergewinnungsraten sind demnach nicht auf eine Änderung des freien Antibiotikagehaltes bzw. auf eine Änderung der Proteinbindung zurückzuführen, sondern vielmehr in den physikalischen Gesetzen der Agardiffusion zu suchen. Im Überstand noch vorhandene Gewebebestandteile, Proteine bzw. Antibiotika-Proteinkomplexe führen zu einer Beeinträchtigung der Agardiffusion, die ihrerseits dann zu kleine Hemmhöfe vortäuscht (Craig und Suh, 1980).

Bei Antibiotikabestimmungen aus Gewebehomogenaten mittels des Agardiffusionsverfahrens ist auf eine ausreichende

Aufbereitung der Überstände zu achten. Reproduzierbare Ergebnisse sind erst dann zu erhalten, wenn am Ende der Zentrifugation ein weitgehendst eiweissfreier Überstand vorliegt. Zu kurze Dauer und zu niedrige Beschleunigung der Zentrifugation würden zu niedrige Wiedergewinnungsraten vortäuschen und somit einen zu hohen Aktivitätsverlust im Gewebe vermuten lassen.

Für die Bindung der Antibiotika an die Eiweisskörper bzw. makromolekularen Stoffe des Serums und Gewebes ist es charakteristisch, dass sich zwischen dem gebundenen und dem freien Anteil des Arzneimittels ein Gleichgewichtszustand einstellt, auf den das Massenwirkungsgesetz anwendbar ist (Klotz et al., 1950; Scholtan und Schmidt, 1962; Kunin, 1964; Scholtan, 1968; Craig und Suh, 1980). Die Bindung der Antibiotika kann somit prinzipiell als reversibel angesehen werden, es sei denn, dass durch die Bindung eine irreversible, zerstörende Wirkung auf die Wirksubstanzen ausgeübt wird (Rolinson und Sutherland, 1965).

Das Ausmass der Eiweissbindung kann entsprechend den Bedingungen des Massenwirkungsgesetzes durch eine Vielzahl von Parametern beeinflusst werden. Zu solchen Faktoren zählen neben der Konzentration und Konstitution des Antibiotikums, der Konzentration des Proteins, der Temperatur und dem pH-Wert ebenso eine mögliche Interferenz der Eiweisse mit anderen Pharmaka.

Die Proteinbindung an menschliche Serumeiweisskörper beträgt für Rifampicin 75 bis 80% (Simon und Stille, 1975), für Cephactril 20 bis 30% (Knothe und Dette, 1980) und für Cefotaxim 35 bis 45% (Esmieu et al., 1980).

Im Vergleich zur Serumproteinbindung werden für den Grad der Gewebebindung bzw. der Inaktivierung in Gewebehomogenaten abweichende Ergebnisse berichtet. Diese sind am ehesten auf eine intra- oder extrazellulär vom Serum differierende Zusammensetzung der bindungsfähigen Bestandteile zurückzuführen (Gillette, 1973; Kuntzmann, 1973). Desweiteren ist das Ausmass der Antibiotikabindung in Serum und Gewebe speziesabhängig (Dingeldein und Wahlig, 1979), wobei die Bindung an Proteine des Humanserums zumeist diejenige anderer Spezies übertrifft (Rolinson und Sutherland, 1965; Keen, 1965; Craig und Welling, 1977).

Für Cloxacillin konnte in menschlichem Serum eine 5-fach höhere Bindung als in Pferdeserum gefunden werden (Rolinson und Sutherland, 1965); das Bindungsvermögen des Pferdeserums lag wiederum deutlich über der des Hundeserums (Verwey und Williams, 1962).

Zur Erklärung dieser Befunde ist die unterschiedliche Albuminkonzentration der verschiedenen Tierseren herangezogen worden. Die beobachteten Unterschiede sind hiermit jedoch nur teilweise zu erklären. Vermutlich spielen Unterschiede in der Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur der bindenden Proteine (Aminosäurezusammensetzung, Aminosäuresequenz und räumliche Anordnung der Polypeptidketten) die Hauptrolle (Scholtan, 1968).

Vergleiche zwischen Angaben der Serumprotein- und Gewebebindung von Antibiotika dürfen demnach, wenn überhaupt, nur unter Vorbehalt durchgeführt werden (Gillette, 1973; Peterson, 1979).

Für die von uns untersuchten Antibiotika konnte bei einer Inkubationstemperatur von 4°C in allen Organhomogenaten ein Wirkungsverlust beobachtet werden. Der Aktivitätsverlust betrug für Rifampicin bei einer eingesetzten Endkonzentration

von 8 µg/ml - je nach Organhomogenat - 48,0 bis 71,0%, für Cephacetril bei einer Endkonzentration von 20 µg/ml 65,0 bis 75,0% und für Cefotaxim bei einer Endkonzentration von 50 µg/ml 41,4 bis 46,0%. Die deutlichen Aktivitätsverluste lassen unmittelbar auf eine relativ hohe Gewebebindung an Leber, Niere und Lunge des Meerschweinchens schliessen.

Das Verhalten der Antibiotikabindung an Serum- oder Gewebeeiweiss bei variablen Antibiotikakonzentrationen wurde in der Literatur vielfach beschrieben (Rolinson und Sutherland, 1965; Scholtan, 1968; Peterson et al., 1977 a, b; Lee et al., 1980). Hierbei wurde über einen weiten Konzentrationsbereich keine Beeinflussung des Grades der Aktivitätsminderung in Abhängigkeit von der eingesetzten Antibiotikakonzentration beobachtet. Erst ab Antibiotikakonzentrationen von über 100 bis 200 µg/ml wird eine Sättigung der freien Bindungsstellen erreicht, die dann bei höherer Dosierung einen steilen Anstieg des freien, nicht gebundenen Antibiotikaanteils bewirkt (Rolinson und Sutherland, 1965; Craig und Suh, 1980).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen fanden wir im untersuchten Konzentrationsbereich für Rifampicin und Cephacetril eine Konstanz des Verhältnisses von gebundenem zu freiem Antibiotikum. Im Gegensatz dazu zeigte sich für Cefotaxim schon bei niedriger Dosierung eine deutliche Zunahme der Rückgewinnungsrate in Abhängigkeit von der eingesetzten Substanzkonzentration. Bei einer eingesetzten Dosis von 5 µg/ml betrug die wiedergefundene Aktivität - je nach Organhomogenat - 22,5 bis 26,9%, die sich bei einer Enddosis von 50 µg/ml bis auf Werte von 54,0 bzw. 58,9% steigerte.

Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten könnte darin

liegen, dass die Bindung des Cefotaxims im Gewebe, im Gegensatz zu anderen Antibiotika, überwiegend an Proteine bzw. makromolekulare Strukturen erfolgt, die in einer geringen molaren Konzentration vorliegen. Demnach würde schon bei relativ niedriger Antibiotikakonzentration ein entsprechend hoher Verlust der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen erfolgen.

Ein ähnliches Verhalten konnte im menschlichen Serum für Cephaloridin und Clindamycin beobachtet werden (Miyake und Ebata, 1976; Craig und Suh, 1980).

Die Bindung der Antibiotika an die Proteine des Serums und Gewebes ist in besonderem Masse von deren Eiweisskonzentration abhängig (Rolinson und Sutherland, 1965; Scholtan, 1968; Wysocki, 1970). Bezüglich der mathematischen Darstellung dieser Beziehung werden unterschiedliche Ergebnisse berichtet. Craig und Suh (1980) beobachteten über einen weiten Konzentrationsbereich eine lineare Abhängigkeit des prozentual gebundenen Antibiotikums vom Logarithmus der Eiweisskonzentration, während Bennet und Kirby (1965) eine solche erst bei doppelt-logarithmischer Auftragung erhielten. Die Versuchsergebnisse anderer Autoren liessen innerhalb eines engen Konzentrationsbereiches auch bei numerischer Auftragung eine proportionale Beziehung zwischen den beiden Grössen erkennen (Dette und Finke, 1979).

Für Cephacetril und Cefotaxim konnten wir in den Organhomogenaten des Meerschweinchens keine Änderung der wiedergefundenen Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Homogenatkonzentration beobachten.

Entsprechende Ergebnisse wurden unter gleichen Versuchsbedingungen für Cefamandol und Cefuroxim gefunden (Ehlers, 1982).

Die fehlenden Aktivitätsverluste bei zunehmender Verdünnung der Homogenate lassen in diesen entweder eine grosse Anzahl bindender Gruppen mit schwacher Affinität oder eine kleine Anzahl mit starker Affinität vermuten (Scholtan, 1964).

Im Gegensatz zu den beiden Cephalosporinen konnte für Rifampicin bei zunehmender Vorverdünnung der Homogenate ein deutliches Ansteigen der Wiedergewinnungsraten erzielt werden. Die Wiedergewinnungsraten lagen in 5%igen Homogenaten - je nach Organ - um 36,4 bis 49,9% über denjenigen von 50%igen Homogenaten.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Untersuchungen, die für Rifampicin in den Gewebehomogenaten des Kaninchens ähnlich hohe Aktivitätsverluste in Abhängigkeit von der eingesetzten Homogenatkonzentration fanden (Gerber et al., 1980).

Bei der Eichkurvenerstellung in Gewebehomogenaten muss daher für Rifampicin auf gleichbleibende Proteinkonzentrationen geachtet bzw. eine proteinabhängige Verminderung der Messwerte rechnerisch ausgeglichen werden. Ein Homogenatstandard mit höherem Proteingehalt als in der Probe würde entsprechend zu hohe und ein solcher mit geringerem Proteingehalt zu niedrige Wiedergewinnungsraten vortäuschen.

Neben einer Inaktivierung der Antibiotika durch Bindung an Proteine bzw. makromolekulare Strukturen kommt ebenfalls eine mögliche Verminderung der biologischen Aktivität durch enzymatischen Abbau in Betracht.

Zeit- und temperaturabhängige Aktivitätsverluste fanden wir für Cepharcetril und Cefotaxim, während Rifampicin in

Puffer und Gewebehomogenaten weitgehendst stabil blieb.

Die älteren Cephalosporine Cephalotin, Cephapirin, Cephacetril und Cefotaxim besitzen in Position 3 des Cephem-Kernes eine Essigsäure-Esterbindung, die durch Hydrolasen des Makroorganismus in unterschiedlichem Ausmass gespalten werden kann (Buhs et al., 1974; Wirt, 1975; Dörhöfer und Faigle, 1976). Die hierbei entstehenden Desacetyl-Verbindungen zeigen teilweise eine antimikrobielle Potenz (Chamberlain, 1980; Wise et al., 1980).

Der zeitabhängige Wirkungsverlust von Cefotaxim betrug nach 360 minütiger Inkubation bei 37°C - bezogen auf die zu Beginn der Inkubation nachgewiesenen Aktivität - im Leberhomogenat 73,3% und im Nierenhomogenat 67,8%. Im Lungenhomogenat konnte keine Aktivitätsänderung nachgewiesen werden. Für Cephacetril fand sich nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C im Leberhomogenat gegenüber der Ausgangsaktivität ein Wirkungsverlust von 45%. Im Nieren- und Lungenhomogenat konnte kein Wirkungsverlust beobachtet werden.

Die zeitabhängigen Aktivitätsverluste nahmen mit steigender Inkubationstemperatur zu. Ein für die Inaktivierung mutmasslich verantwortlicher enzymatischer Abbau konnte somit bestätigt werden.

Bei Spiegelbestimmungen in Organgeweben ist für Rifampicin ein Wirksamkeitsverlust mit Fehlbestimmungen infolge längerer Aufbereitsungszeit bei Zimmertemperatur nicht zu erwarten, während bei Bestimmungen von Cefotaxim und Cephacetril der zeitabhängige Wirkungsverlust berücksichtigt und rechnerisch ausgeglichen werden muss.

5. Zusammenfassung

In einem in vitro-Modell wurde die Beeinflussung der biologischen Wirksamkeit von Cefotaxim, Cephacetril und Rifampicin in Organhomogenaten des Meerschweinchens in Abhängigkeit von verschiedenen experimentellen Parametern untersucht und miteinander verglichen.

Die Wiedergewinnungsraten der Antibiotika änderten sich in Abhängigkeit von der Präparation der Homogenatüberstände. Zentrifugationen von zu kurzer Dauer und zu niedriger Beschleunigung täuschen einen zu hohen Aktivitätsverlust im Gewebe vor.

Für alle untersuchten Antibiotika liess sich in Gegenwart der Organhomogenate ein deutlicher zeitunabhängiger Wirkungsverlust beobachten.

Für Cephacetril und Cefotaxim konnte in den Organhomogenaten keine Änderung der wiedergefundenen Aktivität in Abhängigkeit von der eingesetzten Homogenatkonzentration beobachtet werden. Zunehmende Homogenatverdünnung bewirkte für Rifampicin ein deutliches Ansteigen der Wiedergewinnungsrate.

Zeit- und temperaturabhängige Aktivitätsverluste konnten für Cephacetril im Leberhomogenat und für Cefotaxim im Leber- und Nierenhomogenat gefunden werden, während Rifampicin in Gewebehomogenaten weitgehendst stabil blieb.

Die zeitabhängigen Aktivitätsverluste nahmen mit steigender Inkubationstemperatur zu.

6. Literaturverzeichnis

BENNET, J.V.; KIRBY, W.M.M.: A rapid modified ultrafiltration method for determining serum protein binding and its application to new penicillins. J. lab. clin. Med. 66: 721-732 (1965).

BRUMFITT, W.; LEIGH, D.A.; PERCIVAL, A.; WILLIAMS, J.D.: An assessment of ampicillin in the treatment of urinary tract infection. Postgrad. med. J. 40, Suppl. 55 (1964).

BÜTTNER, H.; PORTWICH, F.: Bestimmung der Bindung von Sulfonamiden an Serumeiweiss mit der Ultrazentrifuge. Arzneim. Forsch. 11: 1113-1137 (1961).

BÜTTNER, H.: Die Messung der Eiweissbindung von Arzneimitteln mit Hilfe der Ultrazentrifuge. In: FREERKSEN, E. (ed.): Antibiotica et Chemotherapia, Karger, Basel, New York, Vol. 12, pp. 95-102 (1964).

BUHS, R.P.; MAXIM, T.E.; ALLEN, N.; JACOB, T.A.; WOLF, F.J.: Analysis of cefotixin, cephalothin and their deacylated metabolites in human urine by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 99: 609-618 (1974).

CHAMBERLAIN, J.; COOMBES, J.D.; DELL, D.; FROMSON, J.M.; INGS, R.J.; MACDONALD, C.M.; McEWEN, J.: J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A: 69-78 (1980).

CHANUTIN, A.S.; LUDEWIG, S.; MASET, A.V.: Studies on the calcium-protein-relationship with the aid of the ultracentrifuge. I. Observations on calcium caseinate solutions. J. biol. Chem. 143: 737-751 (1942).

CRAIG, W.A.; KUNIN, C.M.: Significance of serum protein and tissue binding of antimicrobial agents. Ann. Rev. Medicine 27: 287-300 (1976).

CRAIG, W.A.; WELLING, P.G.: Protein Binding of Antimicrobials: Clinical Pharmacokinetic and Therapeutic Implications. Clin. Pharmacokin. 2: 252-268 (1977).

CRAIG, W.A.; SUH, B.: Protein Binding and the Antibacterial Effects. Methods for the Determination of Protein Binding. In: LORIAN, V. (ed.): Antibiotics in Laboratory Medicine. Williams & Wilkins, Baltimore, London, pp. 265-297 (1980).

DETTE, G.A.; FINKE, U.: Zur Bestimmung des Erythromycins in Organen. Infection 7, Suppl. 2: 207-210 (1979).

DINGELDEIN, E.; WAHLIG, H.: Blood Levels and Tissue Concentrations of Cefazedone in Animals. Arzneim. Forsch. 29 I: 400-403 (1979).

DÖRHÖFER, G.; FAIGLE, J.W.: Beitrag zur Biotransformation von Cephacetril im Menschen. Infection 4, Suppl. 3: 188-194 (1976).

EHLERS, N.: Untersuchungen zur Konzentrationsbestimmung und Inaktivierung neuerer Cephalosporine in Gewebeproben. Inaugural-Dissertation, J.W.Goethe-Universität, Frankfurt am Main (1982).

ERICSSON, H.M.; SHERRIS, J.C.: Antibiotic sensitvity testing. Report of an international colaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B, Suppl. 217 (1971).

ESMIEU, F.; GUIBERT, J.; ROSENGILDE, H.C.; HO, I.; LE GO, A.: Pharmacokinetics of cefotaxime in normal human volunteers. J. Antimicrob. Chemother. 6, Suppl. A: 83-92 (1980).

GERBER, A.; FRIMODT-MÖLLER, N.; CRAIG, W.A.: Tissue Binding of Antimicrobial Agents in Vitro: A Critical Study Focussing on the Concentration of the Tissue Homogenate used. Infection 8, Suppl. 3: 276-279 (1980).

GILLETTE, J.R.: Overview of Drug-Protein Binding. Ann. N.Y. Acad. Sci. 226: 6-17 (1973).

HIERHOLZER, G.; KNOTHE, H.; REHN, J.; KOCH, F.: Fusidinsäure-Konzentration in chronisch entzündetem Gewebe. Untersuchungen zur chronischen posttraumatischen Oestemyelitis. Arzneim.-Forsch. 16: 1549-1552 (1966).

IRMER, W.; SCHEER, M.; SOMMER, T.; ULATOWSKI, L.; WINTER, J.: Sisomicin Konzentrationsbestimmungen in Körperflüssigkeiten und Gewebshomogenaten. Infection 4, Suppl. 4: 417-420 (1976).

KEEN, P.M.: The binding of three penicillins in the plasmas of several mammalian species as studied by ultrafiltration at body temperature. Brit. J. Pharmacol. 25: 507-514 (1965).

KLING, O.: Photometerpraktikum für klinische Chemie. Carl Zeiss, Oberkochen (1969).

KLOTZ, I.M.: Protein interactions. In: NEURATH und BAILEY (eds.): The Proteins, Vol. 1, Part B, Chap. 8, Academic Press, New York, London, pp. 727-806 (1953).

KNOTHE, H.; DETTE, G.A.: Antibiotika in der Klinik. Aesopus Verlag, Basel, München, pp. 145-167 (1980).

KUEMMERLE, H.P.; CONTZEN, H.: Experimentelle Studie zum Verteilungsproblem der Antibiotika (Tetrazyklinderivate) und neuerer Sulfonamide im pathologisch-veränderten Gewebe des Menschen. Chemotherapia 4: 535-562 (1962).

KUNIN, C.M.: Enhancement of antimicrobial activity of penicillins and other antibiotics in human serum by competetive serum binding inhibitors. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117: 69-73 (1964).

KUNIN, C.M.: Binding of Antibiotics to Tissue Homogenates. J. Inf. Dis. 121: 55-64 (1970).

KUNTZMANN, R.; JACOBSON, M.; TSAI, I.; BURNS, J.J.: Certain aspects of drug binding to nonplasma proteins as illustrated by studies with cyclizine, chlorcyclizine and polymyxin B. Ann. N.Y. Acad. Sci. 226: 131-147 (1973).

LEE, F.H.; PFEFFER, M.; VAN HARKEN, D.R.; SMYTH, R.D.; HOTTENDORF, G.H.: Comparative Pharmacokinetics of Ceforanide (B1-S 786R) and Cefazolin in Laboratory

Animals and Humans. Antimicrob. Ag. Chemother. 17: 188-192 (1980).

LINDER, A.: Planen und Auswerten von Versuchen. Reihe der experimentellen Biologie, Bd. 13, Birkhäuser, Basel, Stuttgart, pp. 177 ff (1959).

LINZENMEIER, G.; SCHÄFER, P.; VOLK, H.; GATOS, M.: Bestimmung der Konzentration von Lincomycin in chronisch entzündetem Knochen- und Weichteilgewebe des Menschen. Arzneim.-Forsch. 18: 204-207 (1968).

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.: Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951).

MIYAKE, Y.; EBATA, M.: Binding of cephalothin, cephaloridine and cefazolin to human serum proteins. J. Antibiot. 29: 667-676 (1976).

NORMENAUSSCHUSS MEDIZIN im Deutschen Institut für Normung e.V.: Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (ausser Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. DIN 58 940, Teil 3, Beuth Verlag, Berlin (1976).

NAUMANN, P.: Neue Penicilline. Eigenschaften, Indikationen und Grundelemente der therapeutischen Anwendung. Dtsch. med. Wschr. 88: 165-171 (1963).

PETERSON, L.R.; ZINNEMANN, H.H.; GERDING, D.N.: Standardisation of a Preparative Ultracentrifuge. Method for Quantitative Determination of Protein Binding of seven Antibiotics. J. Infect. Dis. 136: 778-783 (1977 a).

PETERSON, L.R.; GERDING, D.N.; ZINNEMANN, H.H.; MOORE, B.M.: Evaluation of Three Newer Methods for Investigating Protein Interactions of Penicillin G. Antimicrob. Ag. Chemother. 11: 993-998 (1977 b).

PETERSON, L.R.; GERDING, D.N.; McLINN, D.; HALL, W.H.: Predicition of peak penicillin and cephalosporin concentrations in canine serum as derived from in vitro

serum and tissue quantitative protein binding. J. Antimicrob. Chemother. 5: 219-227 (1979).

ROLINSON, G.N.; SUTHERLAND, R.: The binding of antibiotics to serum proteins. Br. J. Pharmacol. Chemother. 25: 638-650 (1965).

SABATH, L.D.: Tissue penetration of antibiotics; an overview. Scand. J. Infect. Dis. Suppl. 14: 313-315 (1978).

SCHOLTAN, W.; SCHMID, J.: Die Binding der Penicilline an die Eiweisskörper des Serums und Gewebes. Arzneim.-Forsch. 12: 741-750 (1962).

SCHOLTAN, W.: Bestimmungsmethoden und Gesetzmässigkeiten der Eiweissbindung von Sulfonamiden und Penicillinen. In: FREERKSEN, E. (ed.): Antibiotica et Chemotherapia. Karger, Basel, New York, Vol. 12, pp. 110-133 (1964).

SCHOLTAN, W.: Die Bindung der Penicilline an die Eiweisskörper des Plasmas und der Gewebeflüssigkeit. In: GSELL, O. (ed.): Antibiotica et Chemotherapia. Karger, Basel, New York, Vol. 14, pp. 53-93 (1968).

SIMON, C.; STILLE, W.: Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. Schattauer-Verlag, Stuttgart, pp. 157-159 (1975)

TIESLER, E.; OKEKE, J.: Vergleichende Spiegelbestimmungen einiger Cephalosporinderivate in Serum und in Gewebehomogenaten im Tierversuch. Klinikarzt 5: 879-880 (1976).

TRUSS, F.; NABERT-BOCK, G.; GRABNER, F.; BIERLICH, K.P.: Penicillin-G-Verteilung in erkranktem Nierengewebe. Med. Welt 22: 1483-1489 (1971).

VERWEY, W.F.; WILLIAMS, H.R. Jr.: Binding of various penicillins by plasma and peripheral lymph obtained from dogs. Antimicrob. Ag. Chemother.: 484-491 (1962).

WEINGÄRTNER, L.: Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung verschiedener Penicillinzubereitungen unter besonderer Be-

rücksichtigung der Gewebespiegel. Zugleich ein Beitrag zur Frage der gegensätzlichen Beeinflussung von Vitamin C und Penicillin. Ärztl. Forsch. 8: 285-307 (1954).

WIRTH, K.: Pharmakokinetik von Cephalosporinen. Inn. Med. 2: 41-47 (1975).

WISE, R.; GILLETT, A.P.; CADGE, B.; DURHAM, S.R.; BAKER, S.: The Influence of Protein Binding upon Tissue Fluid Levels of Six ß-Lactam Antibiotics. J. Infect. Dis. 142: 77-82 (1980).

WYSOCKI, S.: Gewebespiegel verschiedener Antibiotika beim Menschen. Infection 4, Suppl. 2: 115-119 (1976).

WYSOCKI, S.: Gewebespiegel verschiedener Antibiotika beim Menschen. Habilitationsschrift, Heidelberg (1970).

ZEH, K.P.: Untersuchungen zur Stabilität neuer Cephalosporine in Organhomogenaten und Enzymlösungen. Inaugural-Dissertation, J.W.Goethe-Universität, Frankfurt am Main (1981).

Abschliessend möchte ich mich bei allen bedanken, die die vorliegende Arbeit ermöglicht und mich bei ihrer Durchführung unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Knothe für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie Herrn Dr. G. A. Dette für seine Bemühungen und wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

LEBENSLAUF

Am 31. Oktober 1956 wurde ich als Sohn des Industriekaufmanns Josef Pollok und seiner Ehefrau Johanna, geb. Horn, in Frankfurt am Main geboren.

Nach vier Jahren Grundschule besuchte ich ab 1966 das Goethe-Gymnasium in Frankfurt am Main, legte dort im Frühjahr 1975 das Abitur ab und nahm zum Wintersemester 1975/76 das Medizin-Studium an der J.W.Goethe-Universität in Frankfurt am Main auf.

Das Physikum bestand ich im August 1977, das Staatsexamen im Oktober 1981. Die Approbation als Arzt wurde mir am 30. Oktober 1981 erteilt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Untersuchungen zur Gewebebindung und Inaktivierung dreier Antibiotika in Organhomogenaten

im Zentrum der Hygiene der Johann Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Leitung von: Prof. Dr. H. Knothe, mit Unterstützung durch: Dr. G. A. Dette ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 7. Februar 1983